

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA: UNA GALÉNICA EMERGENTE

Discurso del
Excmo Sr. D. JOSE LUIS VILA JATO

Leído en la sesión del día 9 de Marzo de 2006
para su ingreso como Académico de Número

Y contestación del
Excmo Sr.D. ALFONSO DOMINGUEZ-GIL HURLÉ



Madrid, 2006

**NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA:
UNA GALÉNICA EMERGENTE**

**Depósito Legal: C-420/06
I.S.B.N.: 84-689-6765-3**

A mi mujer y a nuestros hijos por
su cariño y apoyo continuos, tanto
a nivél personal como profesional.

INDICE

	Página
Introducción	11
1. Liposomas	20
1.1. Liposomas catiónicos	24
1.2. Liposomas aniónicos	26
1.3. Liposomas pH sensibles	26
1.4. Inmunoliposomas	27
1.5. Liposomas termosensibles	29
1.6. Geles vesiculares fosfolipídicos	29
Aplicaciones clínicas de los liposomas	32
Cáncer	32
Terapia infecciosa	35
Adyuvantes inmunológicos	35
Vacunas ADN	37
Otras aplicaciones	38
2. Micelas poliméricas	40
3. Nanopartículas	45
4. Dendrímeros	59
4.1. Dendrímeros como antivirales	62
4.2. Dendrímeros antibacterianos	64
4.3. Dendrímeros en cáncer	64
4.4. Dendrímeros y agentes de contraste	65
4.5. Dendrímeros y vacunas	65
4.6. Dendrímeros en terapia génica	67
Epílogo	71
Bibliografía	74
Contestación al Discurso de Ingreso a cargo del Excmo Sr. D. Alfonso Dominguez-Gil Hurlé	91

Discurso

del

Excmo. Sr. D. JOSE LUIS VILA JATO

Excmo Sr Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia
Excmas Sras y Excmos Sres Académicos
Sras y Sres

Soy gallego y he desarrollado toda mi actividad formativa y profesional en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela la cual, a lo largo de sus casi 150 años de historia, ha contribuido de forma importante al desarrollo de las Ciencias Farmacéuticas.

Con la perspectiva que me proporcionan mis mas de cincuenta años de permanencia en ésa Facultad puedo hoy decir que en éstos momentos en que me incorporo a ésta Academia me siento acompañado por excelentes antiguos alumnos como los señores académicos Dominguez-Gil, Esteban, Miñones y Ribas y compañeros de claustro como los señores académicos Dominguez-Gil, Dominguez Carmona, Giraldez, Larralde, Miñones, Martinez Fernandez y Ruiz Amil.

Bajo ésta misma perspectiva quiero recordar a mi maestro el Prof Dr. Rafael Cadórniga, el cual me introdujo en el campo de la Farmacia Galénica, y del que aprendí no solo ésta disciplina sino también lo que es el pensamiento científico, el rigor en la investigación y en la interpretación de resultados. Igualmente no puedo olvidar a aquellos colaboradores que a lo largo de muchos años han contribuido entusiásticamente al desarrollo de proyectos de investigación que han hecho que el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de

Santiago de Compostela tenga hoy día un reconocimiento y proyección internacional.

Los académicos doctores Dominguez-Gil, García Sacristan y Doadrio Villarejo presentaron mi candidatura a ésta Real Academia. A ellos mi sincero agradecimiento así como a los demás académicos que apoyaron la propuesta respaldándola con su voto. Prometo esforzarme para no defraudar la confianza y amistad que en mi han depositado.

Al incorporarme en el día de hoy como miembro de número de ésta docta corporación el honor y la responsabilidad se acrecientan al ocupar la vacante de la Medalla nº 30 dejada por el Excmo Sr D. Manuel Lora Tamayo con el que, aun no teniendo trato personal, si quiero señalar la ayuda que, en mis años de estudiante, me proporcionó con un pequeño libro sobre “Problemas de Química Orgánica” que me permitió solventar satisfactoriamente el examen de una asignatura muy problemática para muchos de mis compañeros.

El Profesor Lora Tamayo, de origen andaluz, se licenció en Ciencias Químicas en 1923 y en Farmacia en 1924 desempeñando las plazas de Farmacéutico de la Beneficencia Provincial de Sevilla, Químico de Aduanas y del Cuerpo de Farmacia Militar. Su formación se completa con una estancia en la Universidad de Estrasburgo en la que se interesa por problemas de Química Biológica; en el año 1933 gana la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Medicina de Cadiz, trasladándose en 1935 a la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de Sevilla y posteriormente, en 1942 pasó a ocupar la misma cátedra en la Universidad de Madrid.

Mención aparte merece la labor desarrollada al frente del Patronato Juan de la Cierva del Consejo Superior de Investigaciones Científicas a partir del cual se crearon numerosos Institutos dedicados a los mas variados temas de la investigación aplicada y de desarrollo tecnológico.

En 1962 fue designado ministro del entonces llamado Ministerio de Educación Nacional, nombre que cambió por el de Educación y Ciencia como muestra de su preocupación por el desarrollo de ésta; su iniciativa se ha visto confirmada en el tiempo por el hecho de que ningún político se ha atrevido a que el término desaparezca totalmente de la

Administración. Por otra parte conviene destacar la reorganización de las estructuras universitarias con la creación de los primeros Departamentos vistos como unidades docentes y de investigación constituidas por varias cátedras.

Fue Presidente del Instituto de España, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Académico de la Real Academia de Farmacia y de la Pontificia de Ciencias.

Quiero terminar señalando que el Prof Lora fué un universitario ejemplar, un excelente investigador y un académico que sirve perfectamente de modelo para quienes pertenecemos a ésta Academia.

INTRODUCCIÓN

Los principio activos son en general inadecuados para ser trasladados al organismo sin un vector por lo que la Farmacia ha desarrollado las llamadas formas galénicas, en un claro homenaje a Galeno, adaptadas a las diferentes vías de administración. Toda la galénica tradicional ha sido durante siglos un arte asombroso pero la revolución farmacéutica moderna conmocionó la medicina y cambió la vida de los hombres al permitir la elaboración de medicamentos a escala industrial y que éstos pudiesen llegar a importantes poblaciones de pacientes. Sin embargo, algunos científicos de reconocido prestigio en el campo de la Tecnología Farmacéutica como el Prof Higuchi, consideran que en la primera mitad del siglo XX la formulación de medicamentos era simplemente un *modus operandi* y no una verdadera ciencia.

En la década de los años sesenta se introducen los conocimientos de la Biofarmacia y Farmacocinética que probablemente provocaron la mayor transformación de la Farmacia Galénica al considerar imprescindible el conocimiento de los eventos del medicamento en el organismo humano (medio biológico) con lo que pasan a ser los criterios biofarmacéuticos los que representan un papel fundamental en la formulación y desarrollo de las formas de dosificación. La aplicación de los principios fisicoquímicos y los conocimientos aportados por la Biofarmacia y Farmacocinética han supuesto la consideración de la Farmacia Galénica como una ciencia y, como consecuencia de ello, es en ésta época cuando se dio paso a planteamientos racionales apoyados en bases científicas que han supuesto, como expresaba el Prof Cadórniga en

1980, el abandono de la indicación “hágase según arte” y su substitución por el “hágase según ciencia”.

El desarrollo de nuevas estrategias y sistemas, que se iniciaron mayoritariamente en la década de los años ochenta, tenían como finalidad conseguir una mejor optimización en la liberación del principio activo por medio de lo que actualmente se conoce como liberación controlada; con posterioridad se desarrolló la administración de fármacos a través de nuevas vías como la nasal, colónica, transdérmica, etc. Finalmente se planteó la necesidad de nuevas formas de dosificación adaptadas a la administración de moléculas activas macromoleculares, de naturaleza peptídica o proteica, con requerimientos muy específicos para su administración, de precaria estabilidad en medios biológicos, que con frecuencia precisan de una vectorización u orientación selectiva para conseguir una adecuada acción terapéutica y que actualmente sigue siendo objeto de estudio y perfeccionamiento.

En los últimos años se ha producido un espectacular crecimiento de las nanotecnologías y existe un creciente optimismo acerca de su aplicación a la medicina ya que ellas significarían unas mejores oportunidades de diagnóstico y unas terapéuticas mas efectivas. Ello ha dado lugar a que organismos como el U.S. National Institute of Health (1). U.K. Royal Society and Royal Academy of Engineering (2) y la European Science Foundation (3) hayan acuñado el término de Nanomedicina cuyo objetivo sería “el control, la reparación y la mejora integral de todos los sistemas biológicos humanos, trabajando desde el nivel molecular con dispositivos de ingeniería y nanoestructuras para lograr beneficios médicos”. En ésta definición se incluye el uso de herramientas analíticas para conocer mejor las bases moleculares de las enfermedades así como el diseño de sistemas terapéuticos de nanoescala (de uno a varios cientos de nanómetros) y de producción de medicamentos que propicien terapéuticas mas eficaces.

Estos aspectos implican la identificación precisa de dianas (células y receptores) relacionadas con situaciones clínicas específicas y la elección de adecuados nanovehículos precisos para obtener las respuestas adecuadas y minimizar los efectos secundarios. Los fagocitos mononucleares, células dendríticas, células tumorales y la neovascularización tumoral constituyen en el momento actual las dianas claves (4).

Las recomendaciones de la European Science Foundation fueron recogidas en octubre de 2004 por la Comisión Europea la cual crea las llamadas Plataformas en Nanomedicina en las que, de forma esquemática, los campos de actuación serían los que se recogen en la Figura 1.

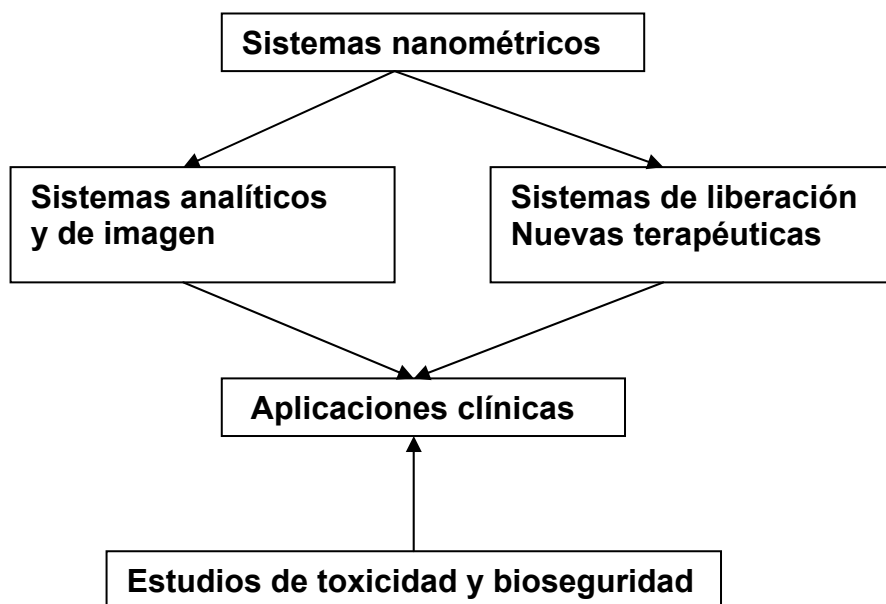


Figura 1: Campos de actuación de los sistemas nanométricos según la European Science Foundation.

Desde el punto de vista científico se señala que Europa es particularmente fuerte en el campo de la física y química de las nanoestructuras por lo que se recomienda que los esfuerzos que se realicen en el futuro traten de orientar las tecnologías existentes hacia los retos específicos de la nanomedicina y la mejora de los conocimientos sobre fabricación, caracterización, reproducibilidad y control de calidad de las nanoestructuras de aplicación biomédica.

En el campo de producción de nuevos fármacos y productos terapéuticos los científicos europeos han promovido el diseño y desarrollo de muchas de las nanomedicinas de primera generación si bien se observa que la organización y financiación de la nanomedicina en

Europa se encuentra actualmente dividida, particularmente si se compara con USA o Japón, lo que puede impedir que no se logre la masa crítica y multidisciplinariedad necesaria para que la investigación y el desarrollo permitan llegar a la obtención de resultados satisfactorios. En éste sentido se cita que entre 2002 y 2004 el número de patentes originadas en el campo de la Nanotecnología ha sido de 8.528 de las que unas 5.500 correspondían a Estados Unidos, del orden 1.300 a Japón mientras que el primer país europeo es Alemania con unas 600 patentes. En el mismo informe se cita que si bien las cinco primeras empresas, en cuanto al número de patentes, pertenecen al área de Informática (la primera es IBM) el mayor número de patentes corresponde al área de conocimiento de Ciencias Biomédicas.

Para resolver éstos problemas se propone la creación de Plataformas de Nanomedicina que permitan una mejor coordinación y conexión de las actividades de investigación, la creación de centros europeos de excelencia en nanomedicina y el desarrollo de mecanismos de financiación con la suficiente magnitud que permita un adecuado alcance y ciclos presupuestarios duraderos.

Como segundo punto débil se señala que para ganar y mantener una posición destacada en la nanomedicina es imprescindible que Europa mejore la transferencia de tecnología y acorte el tiempo que transcurre desde que se completa la investigación hasta que sus resultados se concretan con la llegada de nuevos productos al mercado.

En Julio de 2005 se presenta la Plataforma Española de Nanomedicina que además de recoger los campos de actuación anteriormente señalados, también señala aspectos específicos sobre Toxicidad y Regulación de los nanosistemas y un apartado de Educación y Comunicación que permita una rápida transferencia de los resultados obtenidos por los diferentes equipos que se integran en la Plataforma. En septiembre del mismo año se celebra en Santiago de Compostela la primera reunión de ésta plataforma en la que diferentes grupos multidisciplinarios de investigación presentaron sus líneas de trabajo.

Llegados a éste punto considero que es el momento de conocer como se ha llegado a ésta situación, cuales son los hechos mas sobresalientes que se han producido (5) y que han dado lugar al interés despertado por la Nanomedicina y su futuro desarrollo.

Década

1930	Microscopia electrónica de transmisión
1950	Microscopia electrónica de barrido Watson y Crick dan cuenta de la estructura del ADN
1960	Feynman, en su discurso de Premios Nobel, anticipa el interés que en el futuro tendrá la Nanotecnología. Introducción de los liposomas
1970	Aparición de la resonancia magnética Asociación de radioisótopos a partículas poliméricas Estudios de liberación de fármacos y vacunas a partir de nanopartículas poliméricas
1980	Tecnología ADN recombinante Microscopia de fuerza atómica
1990	Inicio del proyecto Genoma Humano Primera aprobación del FDA para tratamiento con terapia génica Primeros intentos de liberación de ADN a partir de nanopartículas Proteinómica Verma, en una entrevista publicada en Time dice: “solo hay tres problemas en terapia génica: liberación liberación y liberación”
2004	Versión terminada al 99% del Genoma Humano

Para hacer frente a éste reto de la Medicina, la Tecnología Farmacéutica ha desarrollado los sistemas nanométricos que contienen el principio activo (moléculas o fragmentos de moléculas) incluido en un vehículo que lo transporta. Como sistemas nanométricos que son permiten que el fármaco que llevan asociado pueda atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podría realizar con los convencionales sistemas de liberación ya que en éstos son

fundamentalmente las propiedades físicoquímicas las que condicionan su absorción y biodistribución (Figura 2)

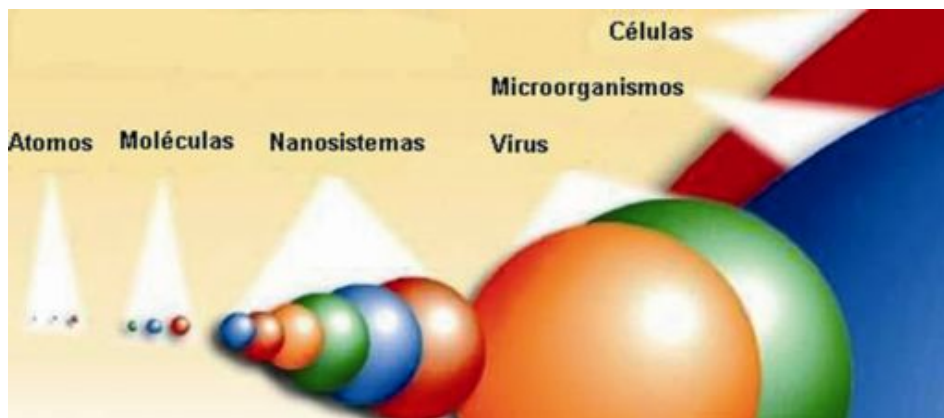


Figura 2: Los sistemas nanoscópicos son mayores que las moléculas típicas y algunos más pequeños que los virus. En su tamaño son similares a muchas proteínas lo que constituye una de las razones por las que pueden interactuar en el interior de las células.

Estos vehículos pueden ser diseñados para que contengan no solo un fármaco sino un agente de diagnóstico o de imagen, un vector que oriente el sistema hacia determinadas áreas del organismo e incluso un sensor indicativo de que el fármaco ha producido el efecto deseado.

Un esquema de lo que podría ser un sistema multifuncional es el que se muestra en la Figura 3 en la que se recoge un dendrímero al que se le ha incorporado un agente de contraste (rX o RMN) , folato como vector que orienta el sistema hacia el receptor folato de la superficie de algunas células tumorales, un indicador como la fluoresceína que permitiría detectar que el sistema se localiza a nivel de las células diana y un citostático como metotrexato o paclitaxel (6).

Si el objetivo de la Farmacia Galénica es la resolución de un problema terapéutico aplicando los conocimientos de la Biofarmacia, la Farmacocinética y la Tecnología Farmacéutica es indudable que la Nanomedicina plantea una nueva orientación de aquella ya que los sistemas que se diseñan van a interactuar en nuevos medios biológicos y

en algunos casos a escala molecular lo cual requiere una amplia colaboración interdisciplinar que, como se ha señalado anteriormente, constituye su característica mas sobresaliente. Por ello es necesaria una estrecha colaboración entre biólogos moleculares, bioquímicos, matemáticos, químicos de polímeros, ingenieros, etc debiendo ser, bajo mi punto de vista, el tecnólogo farmacéutico el que sirva de interlocutor entre el clínico y el equipo multidisciplinar.

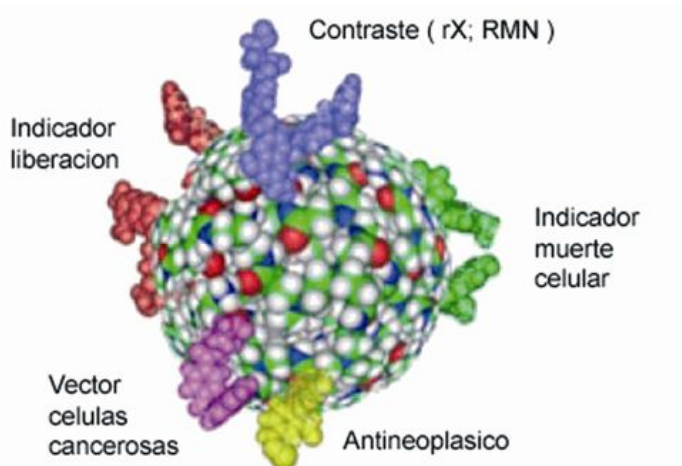


Figura 3: Esquema de un nanosistema multifuncional capaz de identificar células cancerosas y liberar el citostático que contiene

Puesto que la Tecnología Farmacéutica clásica poco tiene que ver con los retos que plantea la Nanomedicina es por lo que he acuñado el término de Nanotecnología Farmacéutica como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulares farmacéuticos teniendo una base científica, cada vez más biológica, que se apoya en los nuevos aspectos biofarmacéuticos como son la fusión con la membrana celular, proteínas transportadoras de membrana, tráfico de los sistemas y moléculas a través del citosol, paso a través de la membrana nuclear, etc y que, de forma esquemática se recoge en la Figura 4

Desde que a comienzos de los años 80 se incorporaron a la terapéutica la insulina y la hormona de crecimiento recombinantes más de 90 medicamentos se han introducido en el arsenal terapéutico y más

de 400 biomoléculas se encuentran en diferentes fases de investigación para el diagnóstico y tratamiento de diversos procesos patológicos. Estos medicamentos entre los que se incluyen péptidos, proteínas, ADN, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, etc (7) presentan un crecimiento muy importante ya que, como puede observarse en la Figura 5, si en el año 2000 las moléculas biotecnológicas constituían solo el 25% de los medicamentos presentados ante la EMEA

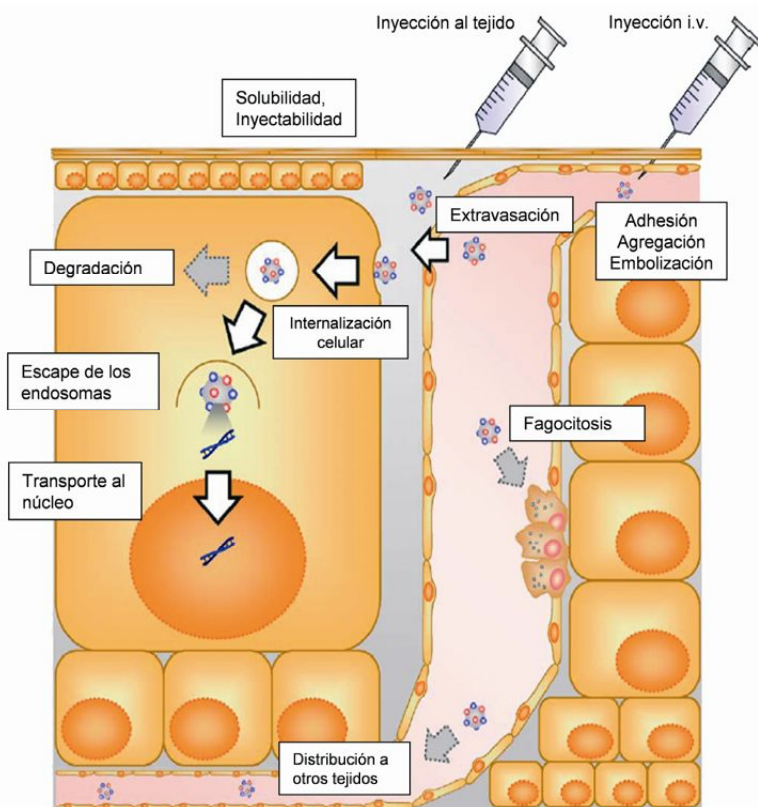


Figura 4: Problemas farmacocinéticos asociados a la administración de fármacos incluidos en nanosistemas (Nishikawa y col.: Ad. Drug Deliver. Rev. 2005)

para su aprobación, en el año 2004 representan ya el 50% debido, en parte, al fuerte descenso experimentado por entidades químicas que hagan unas aportaciones realmente innovadoras.

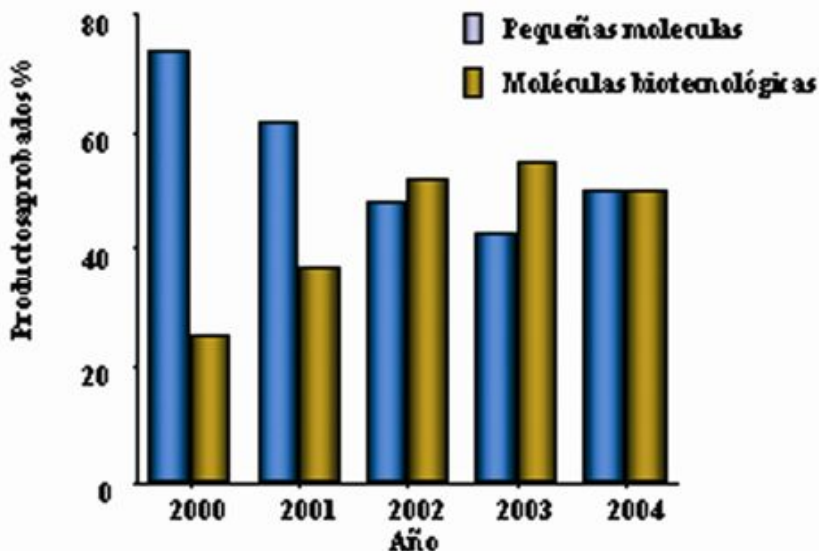


Figura 5: Moléculas presentadas ante la EMEA para su aprobación en el periodo 2000 – 2004

Las propiedades que poseen los productos biotecnológicos frecuentemente limitan su utilización terapéutica ya que en muchos casos se requiere una administración i.v., por su naturaleza presentan una baja biodistribución y un elevado aclaramiento. A pesar de ello, y dado que en muchos casos presentan una elevada actividad intrínseca, se considera que una biodisponibilidad del orden del 10% puede ser suficiente para su administración por una vía extravasal (8).

NANOTECNOLOGIA FARMACEUTICA

Llegados a éste punto creo que es el momento de considerar cual es la situación actual de los sistemas nanométricos y que pueden ser usados en lo que he denominado Nanotecnología Farmacéutica. Si bien algunos de éstos sistemas ya cuentan con una larga trayectoria como vehículos portadores de fármacos sin embargo ha sido en los últimos años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones más interesantes. En éste contexto vamos a centrar nuestra atención en los liposomas, micelas poliméricas, nanopartículas y dendrímeros como sistemas de más amplia utilización en la actualidad.

1. LIPOSOMAS

La evolución de la ciencia y tecnología de los liposomas ha pasado por diferentes fases ya que en su inicio fueron considerados como modelos de biomembranas sobre los que estudiar las propiedades dinámicas, captación y liberación de solutos. En 1970 se realizó en animales la primera administración de liposomas conteniendo diversos principios activos pero solo hasta los años noventa ha sido posible disponer en clínica de fármacos incluidos en liposomas. Este largo tiempo ha sido el necesario para resolver los problemas de una liberación inmediata de fármacos hidrosolubles cuando el sistema se encuentra en medios biológicos, baja estabilidad, baja reproducibilidad en su preparación, inmediata captación por el sistema reticuloendotelial, etc

Los procedimientos actuales de elaboración de liposomas son bastante numerosos, tal como se recoge en la Figura 6 (9) pudiéndose seleccionar el método en función del tipo de liposoma que se desea obtener, la necesidad o no de utilizar disolventes orgánicos, etc.

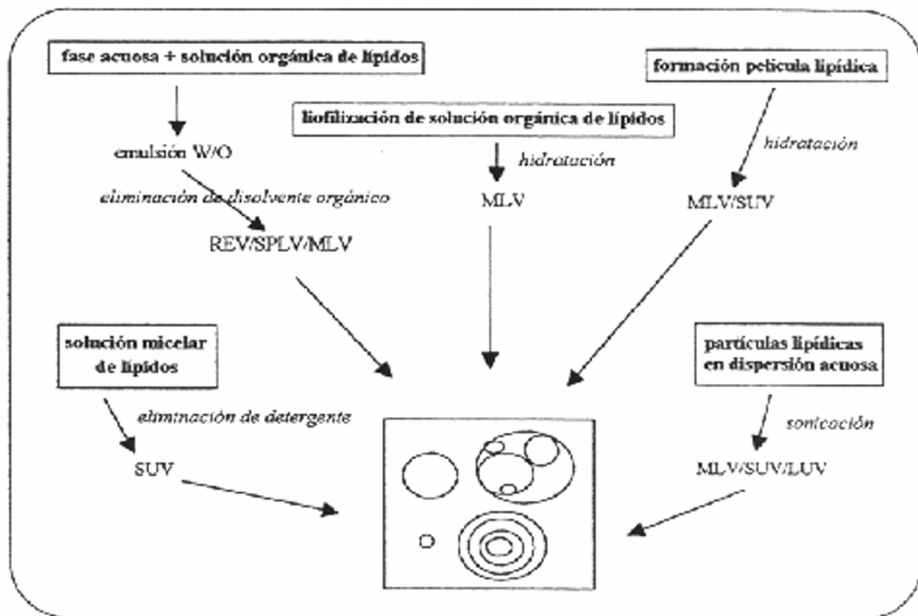


Figura 6: Métodos habitualmente utilizados para la preparación de liposomas

El problema de la reproducibilidad en su preparación ha sido resuelto con las técnicas de sonicación y fundamentalmente la extrusión a través de membranas de policarbonato de diferente tamaño de poro. La estabilización de preparados conteniendo liposomas se logró por medio de la liofilización (10; 11; 12) en presencia de crioprotectores como carbohidratos u oligómeros de la glucosa, o la formulación de los llamados proliposomas (13; 14), particularmente los obtenidos por secado en lecho fluido (15; 16; 17). En ambas estrategias se asume que la forma de evitar la inestabilidad, tanto física como química, es la conservación en ausencia de agua.

La desestabilización que sufren los liposomas al alcanzar el torrente circulatorio está relacionada con la interacción que se produce con las lipoproteínas de alta densidad. Aunque no es totalmente conocida la interacción se sabe que las HDL actúan removiendo bicapas lipídicas lo cual facilita la adsorción o inclusión de opsoninas como fibronectina, proteína C reactiva, α -2 macroglobulina, etc que juegan un papel importante en el reconocimiento de los liposomas y otras partículas por parte de los macrófagos (Figura 7) (18)

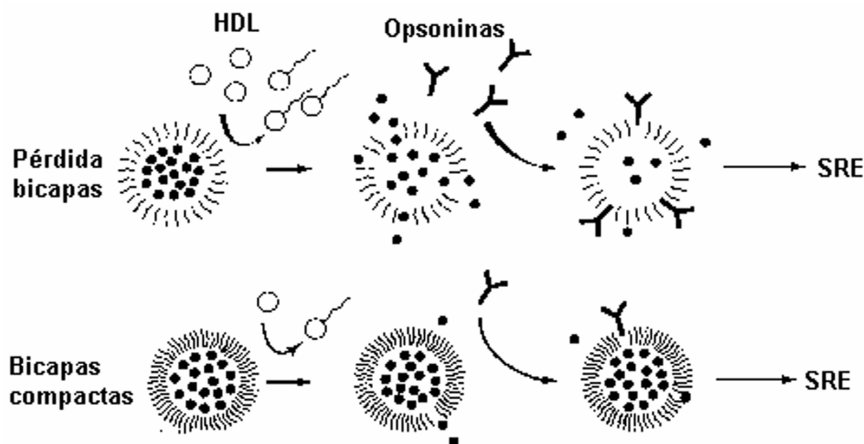


Figura 7: Relación entre la estabilidad de los liposomas y su aclaramiento de la circulación sanguínea.

El conocimiento del papel desempeñado por las lipoproteínas en el aclaramiento de los liposomas ha impulsado, a partir de mediados de la década de los años 90, el desarrollo de los llamados liposomas stealth o

estéricamente estabilizados recurriendo al recubrimiento con polímeros hidrofílicos y flexibles (19; 20; 21). De entre los polímeros que presentan éstas características y que sean biocompatibles son los polietilenglicoles (PEG) (22) los que han suscitado mayor interés y sobre los que se han centrado los esfuerzos de un gran número de investigadores. En general, la incorporación de PEG requiere una modificación de su molécula con un resto hidrofóbico de tal forma que éste se inserte en la membrana siendo los derivados de PEG con diesteroilfosfatidiletanolamina los que mejor comportamiento presentan a la hora de asegurar la unión permanente de éste polímero a la estructura vesicular (23)

La presencia de PEG en la superficie de los liposomas previene la adsorción de proteínas siendo ésta propiedad la responsable de la larga semivida que presentan *in vivo* (24). Además es posible la utilización de composiciones de membrana muy diversas con la consiguiente ventaja a la hora de encapsular moléculas tanto de carácter hidrofílico como hidrofóbico (25).

Debido al carácter anfipático que presentan los PEG y sus derivados deben incluirse en bajas proporciones en la composición de la membrana ya que, cantidades elevadas, dan lugar a estructuras micelares (26). Por otra parte la proporción de éstos derivados va afectar a la eficacia de encapsulación, al tamaño del liposoma y a la liberación del material encapsulado (27).

No todos los PEG incrementan el tiempo de semivida de los liposomas en circulación ya que es necesario una mínima longitud de la cadena habiéndose establecido un peso molecular mínimo de 2.000 D (27). A ello habrá que añadir que, además de la longitud de la cadena de PEG, va a influir el tamaño del liposoma habiéndose observado que los mejores resultados, en cuanto a tiempo de semivida, se obtienen cuando se sitúa entre 70-200 nm (28).

Las últimas investigaciones acerca del recubrimiento de liposomas con PEG se dirigen hacia la síntesis de derivados de PEG con grupos terminales ácidos o alcohólicos (29) o bien de derivados de PEG que permitan la pérdida del grupo polar y favorezcan la liberación del material encapsulado en determinadas condiciones (30). En la Tabla 1

se recogen algunos de los polímeros que pueden utilizarse para el recubrimiento de liposomas (31)

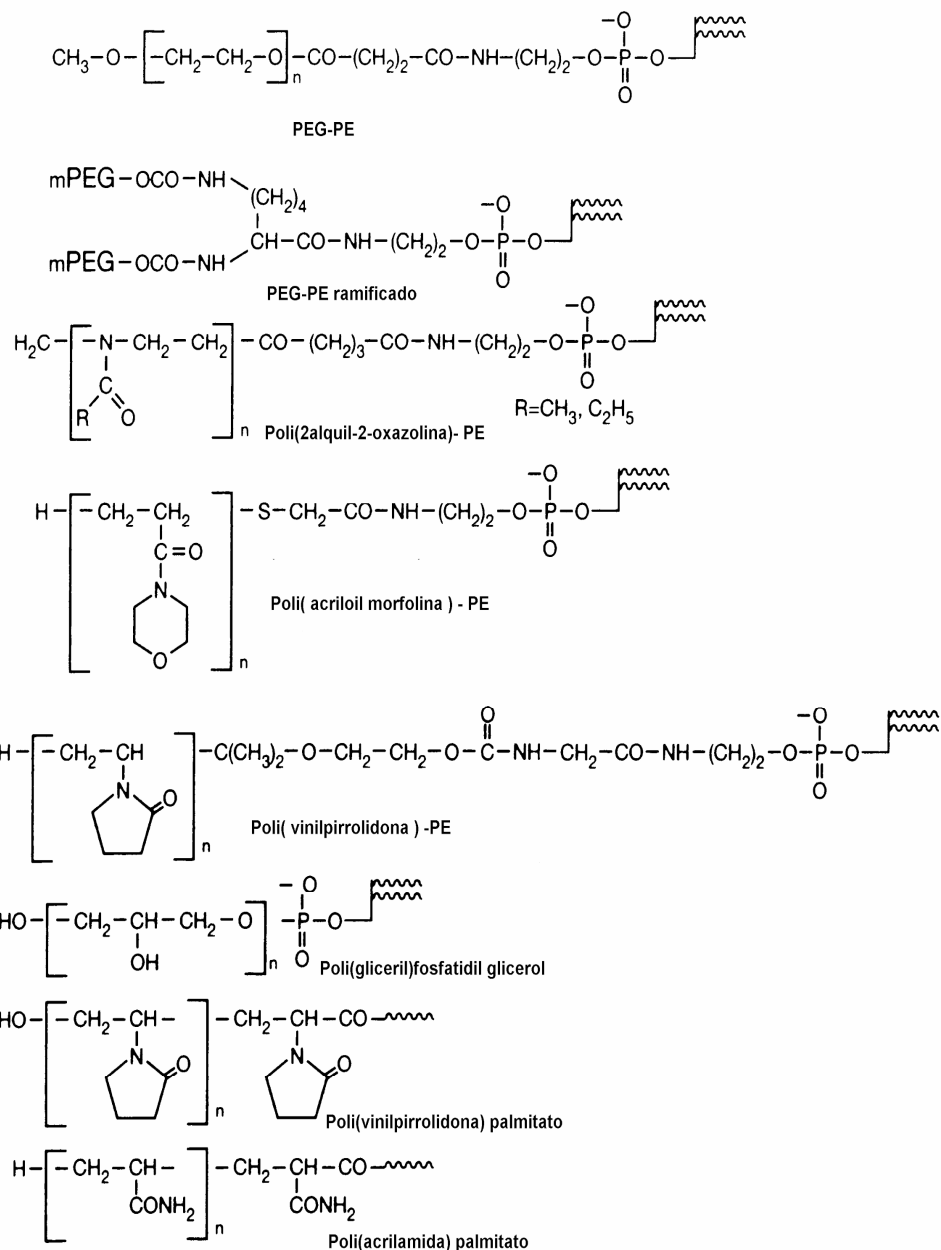


Tabla 1: Estructura de algunos polímeros utilizados para la preparación de liposomas estéricamente estabilizados.

El hecho de que los endotelios de los tumores sean más permeables y reciban un mayor aporte de sangre ha dado lugar a la idea de que puedan alcanzar el fluido intersticial nanosistemas que liberarían el principio activo que contienen; para ello se requiere que el sistema presente una elevada semivida en plasma por lo que los liposomas pegilados han sido los primeros candidatos utilizados para desarrollar ésta idea, particularmente después de los resultados obtenidos con la doxorubicina (32)

La estabilidad de los liposomas pegilados no siempre es deseable para conseguir una adecuada liberación del fármaco. Si el sistema es internalizado por endocitosis la presencia de la cubierta de polietilenglicol puede impedir la liberación del fármaco del endosoma. Por ello se ha propuesto la utilización de sistemas que tengan una unión lábil PEG-lípido que se rompa en el medio ácido de la vacuola endocítica o en el medio ácido de la masa tumoral (33)

1.1 LIPOSOMAS CATIÓNICOS.- El primer ensayo clínico sobre terapia génica utilizando liposomas catiónicos fue realizado en 1992 (34) ; los liposomas fueron preparados a base de una mezcla 3 β (N- (N-N-dimetilaminoetano) -carbamoil) colesterol y DOPE. Desde entonces numerosos estudios (35; 36) han demostrado que las formulaciones a base de liposomas catiónicos pueden ser utilizadas como portadores de diferentes plásmidos para su incorporación a células tanto “in vitro” como “in vivo” y actualmente el 13% de los ensayos clínicos sobre terapia génica utilizan liposomas catiónicos (37).

Estos liposomas unilamelares, de carácter no inmunogénico y fáciles de producir a escala industrial, se preparan a base de mezclas de lípidos catiónicos y zwiterion . Los lípidos catiónicos (Figura 8) están constituidos por estructuras anfifílicas con resto apolar formado frecuentemente por dos cadenas de ácidos grasos y una cabeza polar catiónica, que es la que marca diferencia entre ellos, siendo las aminas cuaternarias y poliaminas como espermina, spermidina, etc los grupos funcionales mas utilizados. Actualmente estan comercializados mas de veinte lípidos catiónicos siendo los mas populares la mezcla a partes iguales de dioleiloxipropil trimetilamonio (DOTMA) con dioleilfosfatidiletanolamina que se conoce con el nombre de Lipofectina, el dioctadecildiamidodiecilespermina (DOGS) , con el nombre de

Transfectan y 2,3 dioleoxi N- (2- (espermin carboxiamido) etil) – N,N dimetil 1 propanamino (DOSPA) con el nombre de Lipofectamina.

Los lípidos de carácter zwiterión o lípidos facilitadores intervienen en la interacción entre membrana celular y liposoma y son frecuentemente DOPE y colesterol

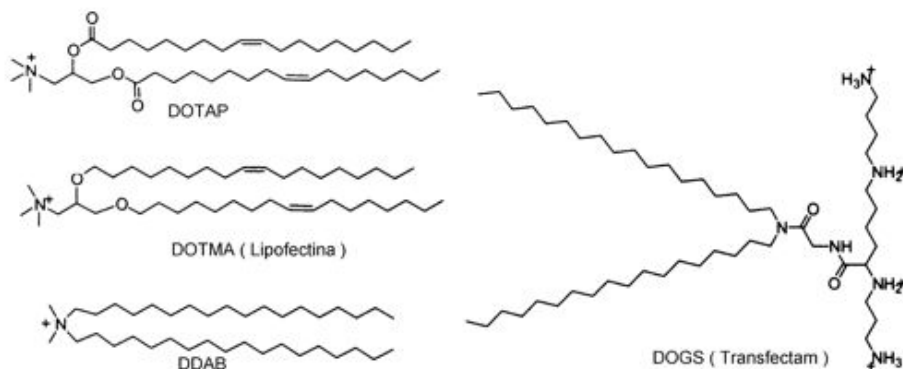
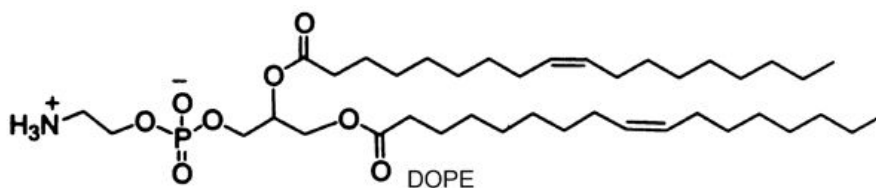


Figura 8: Estructura de los lípidos mas habitualmente utilizados en la preparación de los liposomas catiónicos



Por otra parte la compactación del DNA con policationes como la protamina, antes de la adición del liposoma, permite un importante incremento en la efectividad del sistema (38)

El gran interés despertado por los liposomas catiónicos ha dado lugar a estudios de toxicidad, tanto in" vitro" (39) como" in vivo" (40; 41). Empleando ensayos de proliferación celular, como por ejemplo la incorporación de timidina tritiada y tests de citotoxicidad, como la liberación de lactato deshidrogenasa, han punto de manifiesto que liposomas catiónicos a base de DDAB-DOPE son citotóxicos para las células CASKi, una línea celular de cancer cervical humano . Los liposomas catiónicos también han demostrado toxicidad pulmonar dosis dependiente cuando se realiza en el ratón una administración intratraqueal

probablemente a través de una estimulación de intermediarios de oxígeno reactivo que previamente se habían identificado en toxicidad pulmonar (42). En otro estudio se ha demostrado que éstos liposomas son citotóxicos para los macrófagos fagocíticos y que la substitución de DOPE por DPPC (1-2 dipalmitoil-sn-glicero-3- fosfatidilcolina) reduce la toxicidad, sugiriéndose que el lípido DOPE juega un papel en la toxicidad de los liposomas catiónicos (43)

Los liposomas catiónicos siguen presentando problemas de inestabilidad en plasma y bajas eficiencias de transfección lo cual determina que, en el momento actual, no es posible utilizar éstos vehículos como eficientes portadores de material genético. Posiblemente la introducción de nuevos lípidos catiónicos y zwitterion así como modificaciones en la formulación permitirán un avance en éstos sistemas.

1.2: LIPOSOMAS ANIÓNICOS: Estos liposomas se han propuesto en los últimos años como vehículo para la liberación de oligonucleótidos (44) y liposomas fluidos a base de DPPC y 1,2 dimiristoil- sn-glicero-3- (fosfo-rac-1 glicerol) (DMPG) que han demostrado su capacidad para liberar oligonucleotidos con marcador fluorescente a células bacterianas (45). Recientemente se han propuesto éstos vehículos como alternativa a los liposomas catiónicos para la liberación de ADN (46). La tecnología utilizada consiste en el empleo de lípidos que, como componentes fisiológicos, no muestran toxicidad como por ejemplo una mezcla de DMPG como lípido aniónico y DOPE como lípido zwitterion. A ésta mezcla se le incorpora ADN complejado con ión calcio encontrándose que éste último tratamiento induce una transfección siete veces mayor tanto “in vitro” como “in vivo” en células de mamíferos.

En el momento actual los liposomas aniónicos se consideran útiles para la transferencia de ADN en líneas celulares en las que los liposomas catiónicos han mostrado su toxicidad.

1.3: LIPOSOMAS pH SENSIBLES: Este tipo de liposomas se pueden obtener con la inclusión de DOPE en liposomas conteniendo lípidos ácidos como colesterylhemisuccinato o ácido oleico. En el momento actual existen varios sistemas que permiten preparar liposomas pH sensibles como mezclas de lípidos, lípidos con tensoactivos, lípidos mas péptidos, y lípidos asociados a polímeros biodegradables (47). A pH 7 éstos lípidos mantienen la estructura de la bicapa lipídica pero después de su internalización en el endosoma sufren una protonización (a pH

aproximado de 5,5) , se colapsan y sufren una desestabilización (transición de fase laminar a hexagonal H11) y rotura de la bicapa endosómica lo que determina una rápida liberación de ADN en el citoplasma. Estudios “in vitro” han puesto de manifiesto la capacidad de expresar β galactosidasa y luciferasa en diferentes líneas celulares de mamíferos (48).

Los liposomas pH sensibles preparados inicialmente eran aniónicos al pH fisiológico de 7,4 por lo que existía una limitación en la captación celular al producirse una repulsión entre la carga negativa del liposoma y la membrana celular. Por otra parte, y debido al mismo carácter aniónico, la eficiencia de encapsulación de ADN es muy baja (49) por lo que se han propuesto mezclas de lípidos o lípidos con péptidos o tensoactivos que al pH fisiológico proporcionan una carga positiva la cual se modifica con la acidificación del medio (50).

La utilización de liposomas pH sensibles pegilados supone una estabilización del sistema en presencia de plasma y produce una modificación importante en la biodistribución. Aunque la pegilación reduce “in vitro” la sensibilidad al cambio de pH sin embargo los estudios “in vivo” muestran la capacidad del sistema para liberar su contenido del endosoma al citosol (51).

Finalmente, los últimos estudios con liposomas pH sensibles, se orientan hacia la consecución de una biodistribución selectiva mediante la unión covalente de diferentes ligandos conteniendo grupo amino como péptidos o proteínas (52) y utilizar derivados de DOPE, como citraconil-DOPE, que ha mostrado su utilidad en la liberación de ADN a células cancerosas (53) , o bien la combinación con fosfatidilcolina-glicirricina (54).

1.4: INMUNOLIPOSOMAS: Constituyen sofisticados sistemas desarrollados para conseguir una vectorización selectiva incorporando anticuerpos funcionales a la bicapa lipídica (55). Para ello, aun siendo necesario que tengan una larga semivida en plasma, resulta también importante que la liberación del fármaco tenga lugar al producirse la fijación del sistema sobre la célula diana ya que se ha visto que la acumulación de los inmunoliposomas en células tumorales no siempre va acompañada de una mayor actividad. Por otra parte, la fijación de cada anticuerpo, requiere una formulación específica.

Las células tumorales expresan antígenos que pueden ser utilizados para su fijación a liposomas y así recientes estudios con liposomas conteniendo un fragmento de anticuerpo frente al receptor humano de transferrina han puesto de manifiesto la capacidad liberadora de material genético “in vivo” en células tumorales (56; 57; 58). Schnyder y col (59) utilizan un anticuerpo monoclonal del receptor transferrina de rata que se incorpora a liposomas, conteniendo daunomicina, que poseen un grupo terminal de biotina unido a la cadena de polietilenglicol. Los estudios farmacocinéticos han permitido establecer que éstos liposomas reconocen el receptor transferrina que se encuentra en la barrera hematoencefálica permitiendo, vía transcitosis mediada por receptor, una acumulación del citostático a nivel cerebral.

Igualmente la sobreexpresión de receptores folato encontrados en cáncer ovárico ha dado lugar a la preparación de liposomas conteniendo DSPE-PEG-folato (Figura 9) (60)

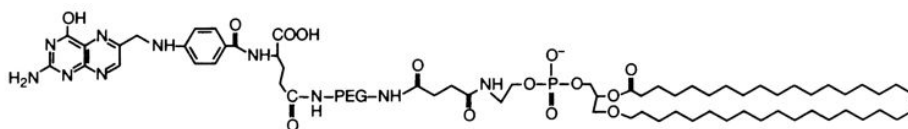


Figura 9: Estructura del complejo DSPE-PEG-Folato

En principio los vectores específicos fueron coinmovilizados con un polímero que sirviese como estabilizador estérico (frecuentemente cadenas de PEG) (Figura 10 a) pero pronto se pudo comprobar que las cadenas del polímero estabilizador podían interferir la interacción entre el anticuerpo y su receptor específico. Por ello se han desarrollado otro tipo de inmunoliposomas que poseen el anticuerpo situado en la parte externa del sistema y fijado, a través de las cadenas de PEG al liposoma (Figura 10 b).

Para conseguir ésta estructura generalmente se emplea diesteroilfosfatidildietanolamina estando las cadenas de PEG fijadas por un enlace uretano y grupos funcionales terminales en la cadena polimérica de PEG a través de los cuales se realiza la fijación del anticuerpo. Algunos de los grupos terminales que sirven para la fijación del anticuerpo se recogen en la Tabla 2

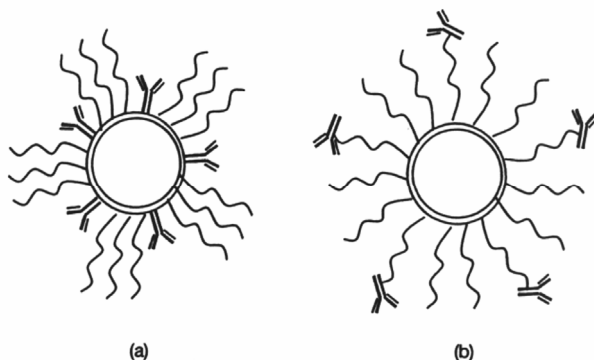


Figura 10: Dos maneras de fijar ligandos específicos a liposomas pegilados: **a** co-inmovilización del ligando entre las cadenas superficiales de PEG ; **b** fijación del ligando a la cadena terminal de PEG

Otros ligandos como por ejemplo carbohidratos han sido utilizados para que se produzca la interacción entre el liposoma y selectinas y otros receptores de la membrana celular (61; 62)

1.5 LIPOSOMAS TERMOSENSIBLES: Son sistemas cuya membrana lipídica es estable a 37°C pero que presentan una temperatura de transición de fases del orden de 40°C como la que puede existir en el interior de tumores o se puede alcanzar en áreas externas locales expuestas a una fuente calorífica.

Los liposomas termosensibles encuentran aplicación clínica en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna que ha sido aprobado por la FDA en febrero de 2004 (Prolieve Thermodilatation System[®]). Otro ensayo clínico con liposomas termosensibles incluye doxorubicina (Thermodox[®]) (63).

Los liposomas termosensibles representan un avanzado sistema de liberación de fármacos antitumorales si bien presentan limitaciones como la imposibilidad de tratar metástasis profundas y las dificultades existentes en cuanto a la capacidad de retención del fármaco (64)

1.6 GELES VESICULARES FOSFOLIPIDICOS: Desde un punto de vista tecnológico los liposomas de menos de 200 nm. presentan el problema de una baja eficiencia de encapsulación, particularmente con

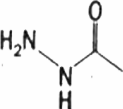
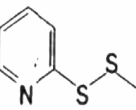
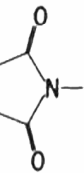
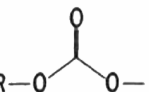
X	
$\text{H}_2\text{N}-$	Usado para la preparación de grupo terminal funcionalizado y ligando PEG-DSPE vía modificación del grupo amino. Amino-PEG-DSPE forman liposomas con largo tiempo de circulación y carga +
$\text{HO}_2\text{C}-$	Util para posteriores modificaciones y reacciones de conjugación vía carbodimida. Empleado en la preparación de inmunoliposomas
	Hidrazida-PEG-DSPE ha sido introducido para la conjugación de anticuerpos con las cadenas de PEG o para la conjugación N terminal de serina o treonina
	Unión de grupos ligando a través de enlaces disulfuro. Precursor para HS-PEG-PE y acoplamiento de maleimida y bromoacetil conteniendo ligandos que se fijen a liposomas
	Maleimido-PEG-PE se emplea para la fijación de fragmentos Fab y otros ligandos conteniendo grupos tiol como la cisteína existente en péptidos
	Nitrofenil carbonatos (R=nitrofenil) son útiles para la unión de ligandos conteniendo grupos amino y otros restos funcionales que formen una unión uretano

TABLA 2. Grupos funcionales terminales de polímeros-lípidos con la estructura general X-PEG-DSPE usados para la introducción de ligandos en liposomas. El resto PEG-DSPE en muchos casos es uretano unido a PEG de peso molecular 2.000

fármacos hidrosolubles. Para resolver éste problema se han desarrollado los llamados geles vesiculares fosfolipídicos que contienen elevadas concentraciones de fosfolípidos (250 – 600 mg/g) en forma de dispersiones de consistencia semisólida (65) con las siguientes ventajas tecnológicas:

- . Pueden contener fármacos de carácter hidrófilo, lipófilo o anfifílico
- . Mantienen una encapsulación constante durante largos tiempos de almacenamiento.
- . La dispersión puede transformarse en liposomas unilamelares pequeños (SUV) por adición de agua y suave agitación; en condiciones adecuadas los pequeños liposomas mantienen la carga de fármaco.
- . Se preparan con fosfolípidos convencionales, bien caracterizados, como la fosfatidilcolina y colesterol

Estos sistemas han sido utilizados para incorporar gemcitabina , cuya utilización clínica en tumores sólidos se ve comprometida por la baja semivida (8-12 minutos) por lo que debe administrarse a dosis altas (1g/m^2) semanalmente. Para prevenir su rápido metabolismo y aumentar su eficacia in vivo se ha desarrollado una formulación en la que el agente antitumoral se encuentra en forma de gel vesicular fosfolipídico; tras demostrarse el mantenimiento de la actividad antitumoral se encontró una acumulación 4 veces mayor, debida a una mayor semivida (Figura 11) (66).

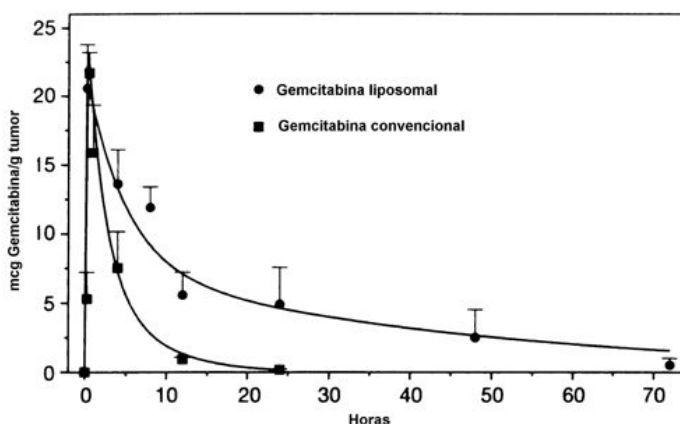


Figura 11: Niveles en tejido tumoral de gemcitabina administrada en la forma convencional y gel vesicular fosfolipídico.

Otros tipos de liposomas que se encuentran en fases mas tempranas de desarrollo son los liposomas sensibles a la luz (67) , liposomas redox (68) y los llamados arqueosomas (69) que presentan interés por sus características de estabilidad frente al calor, pH y solventes orgánicos; éstos últimos presentaban el problema de la dificultad de obtener los lípidos bacterianos pero en los últimos años ha sido posible obtener lípidos análogos como por ejemplo un dimérico de la fosfatidiletanolamina unida a una larga cadena de ácido graso (70). Los estudios de estabilidad y baja toxicidad han demostrado que los arqueosomas pueden constituir una alternativa superior a los liposomas convencionales. Recientemente se han revelado como un interesante sistema de liberación para vacunas frente al cancer (71).

APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS LIPOSOMAS

Cáncer: La utilización de los liposomas como vehículos para contener fármacos antineoplásicos ha sido ampliamente estudiada tanto para fármacos de bajo peso molecular como para péptidos y proteínas así como citoquinas y otros inmunomoduladores con objeto de activar macrófagos y convertirlos en tumoricidas. Finalmente material genético como ADN, oligonucleótidos y ribosomas han sido también incluidos en liposomas, tal como se recoge en la Tabla 3:

Una amplia variedad de fármacos citostáticos han sido incluidos en liposomas y aunque en algunos casos se ha encontrado un incremento de la toxicidad en otros, fundamentalmente los que contienen antraciclinas, su toxicidad se ha visto disminuida. El hecho de que los vasos resultantes de la respuesta angiogénica inducida por las células tumorales presenten una mayor permeabilidad permiten el paso de liposomas de un tamaño de 50 nm; ello unido a un menor drenaje linfático determina que éstos nanosistemas se acumulen y que ésta acumulación esté relacionada con el tiempo de permanencia en el torrente circulatorio.

Esta idea es la base en la que se fundamentan las especialidades comercializadas conteniendo doxorubicina (Doxil[®] y Daunosome[®]), citarabina (Depocyt[®]) y vincristina que ha sido presentada a la FDA para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin tratados con al menos dos regímenes quimioterápicos.

Con la misma idea se han preparado formulaciones de paclitaxel en liposomas; éste fármaco es muy poco soluble y las formulaciones comercializadas llevan como vehículo Cremophor/etanol por lo que la administración i.v. debe realizarse lentamente. Una de las formulaciones en liposomas se presenta al estado sólido y, después de su hidratación, se obtienen liposomas de unos 100 nm y con un 95% del paclitaxel incorporado en la bicapa lipídica. Cuando se inyecta ésta formulación el fármaco se va liberando lentamente y acumulándose en las células tumorales (72)

Principio activo	Indicación
Daunorubicina	Sarkoma de Kaposi
Doxorubicina	Terapia combinatoria en cáncer de mama
Doxorubicina en Liposomas pegilados	Sarcoma de Kaposi refractario; cáncer de ovario; cáncer de mama refractario
Citarabina	Meningitis linfomatosa
Vincristina	Linfoma no Hodgkin
Lurlotecan	Cáncer de ovario
Acido Trans-retinoico	Leucemia promielocítica aguda; Linfoma no Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; carcinoma de células renales
Derivados de platino	Diversos tumores
Annamicina	Tumores resistentes a doxorubicina
E 1ª gen	Diversos tumores
Plásmido ADN codificando HLA-B7 Alovectina 7 y $\alpha 2$ microhemoglobina	Melanoma metastásico

Tabla 3: Principios activos incluidos en liposomas aprobados para utilización clínica o en fase de investigación

El uso de ligandos que favorezcan la vectorización de los liposomas hacia células tumorales constituye, como se ha expuesto al hablar de los inmunoliposomas, un campo que está recibiendo creciente interés. Los estudios mas recientes recogen la utilización de liposomas conteniendo doxorubicina estericamente estabilizados con cadenas de polietilenglicol a las cuales se fija un fragmento de anticuerpo Fab'. Estos liposomas se fijan preferencialmente sobre tumores en los que se encuentra sobreexpresado el receptor HER2

Una estrategia totalmente diferente en el tratamiento del cáncer consiste en el empleo de liposomas que liberen a macrófagos factores de activación como citoquinas. Un método de activación consiste en la incorporación de derivados liposobles de muramil-dipéptido a liposomas enriquecidos con fosfatidilserina. Tras la administración i.v. los liposomas son captados preferentemente por macrófagos del tejido pulmonar en el que frecuentemente se desarrollan metástasis. Actualmente se están realizando ensayos clínicos en pacientes con osteosarcoma en los que la quimioterapia no ha destruido células tumorales residuales.

Una reciente estrategia para el tratamiento del cáncer se dirige hacia la angiogenesis ya que se ha estimado que la eliminación de una sola célula endotelial puede inhibir el desarrollo de 100 células tumorales (72). Los vasos sanguíneos tumorales poseen receptores a los que se unen factores para el desarrollo vascular como el factor de crecimiento vascular y $\alpha v \beta 3$ integrina; inhibiendo la diana de éstos factores se produce la apoptosis de las células formadoras de vasos sanguíneos. Diversos péptidos pueden unirse a la $\alpha v \beta 3$ integrina inhibiendo la angiogenesis y además pueden fijarse a liposomas a través de cadenas de PEG. Entre éstos péptidos se encuentra el llamado péptido cíclico RGD (Arg-Gli-Asp-Phe-Lis) que se ha incorporado a liposomas conteniendo 5-fluorouracilo (73).

La apoptosis constituye una reciente vía para el tratamiento del cáncer; en éste sentido inmunoliposomas conteniendo fenretinida y el gangliósido GD2 inducen apoptosis en líneas celulares de neuroblastoma y melanoma y en ratones han demostrado una fuerte actividad antineuroblastoma tanto in vitro como in vivo (74). Matsumoto y col (75) han publicado recientemente que liposomas híbridos constituidos por liposomas y micelas a base de dimiristoilfosfatidilcolina y

polioxietileno (10) dodecileter son capaces de inducir apoptosis en células tumorales, a través de las señales producidas por las caspasas 3, 8 y 9, lo cual abre un interesantísimo campo de investigación con éstos nuevos sistemas

Terapia antiinfecciosa: Los liposomas han sido ampliamente utilizados como sistemas de liberación de fármacos para tratar procesos infecciosos producidos por bacterias, hongos, virus y parásitos. La utilización de liposomas para la liberación pasiva de inmunomoduladores a macrófagos ya ha sido comentada anteriormente en el caso del cancer pero la misma idea puede aplicarse para procesos infecciosos ya que se ha visto que la activación de macrófagos por medio de liposomas conteniendo muramildipeptido o interferon β permiten una respuesta satisfactoria frente a diversos procesos infecciosos.

La fagocitosis de microorganismos y el desarrollo de los mismos en las células huésped supone una dificultad en el tratamiento con fármacos antiinfecciosos debido a su baja penetración. Esta misma actividad fagocitaria puede ser utilizada para la captación de liposomas y que éstos liberen el principio activo en el interior de las células. Estudios realizados inicialmente con liposomas conteniendo derivados de antimonio para el tratamiento de la leishmaniosis demostraron un amplio incremento del índice terapéutico debido a un aumento de la actividad y reducción de los efectos tóxicos. Mas recientemente se han observado efectos similares en una amplia variedad de infecciones producidas por bacterias hongos y virus (76).

Según nuestro conocimiento no se está trabajando en fase preclínica con nuevas moléculas de aminoglucósidos, pero si se investiga con éstos fármacos, especialmente con amikacina, vehiculizados en liposomas, lo que permitiría una mayor concentración intracelular y una menor toxicidad en el tratamiento de la tuberculosis multirresistente y la endocarditis.

Adyuvantes inmunológicos: Desde 1974 se conoce que los liposomas pueden actuar como adyuvantes inmunológicos si bien no se conoce cual es exactamente el mecanismo de actuación habiéndose propuesto un efecto depot, la tendencia a migrar a nódulos linfáticos tras su inyección local o bien a ser endocitados por las células M de las Placas de Peyer, tras su administración oral.

Muchas de las preparaciones de antígenos necesitan el complemento de adyuvantes para reforzar la respuesta inmune frente a antígenos específicos. En éste sentido la tecnología virosomal representa un importante avance ya que mejora la presentación de antígenos específicos a las células inmunes.

Los virosomas están constituidos por liposomas que contienen proteínas virales en su membrana. Estas proteínas permiten a las membranas de los virosomas fusionarse con las células del sistema inmune y así liberar su contenido en las células diana específicas. Un esquema de la composición de un virosoma sería la recogida en la Figura 12

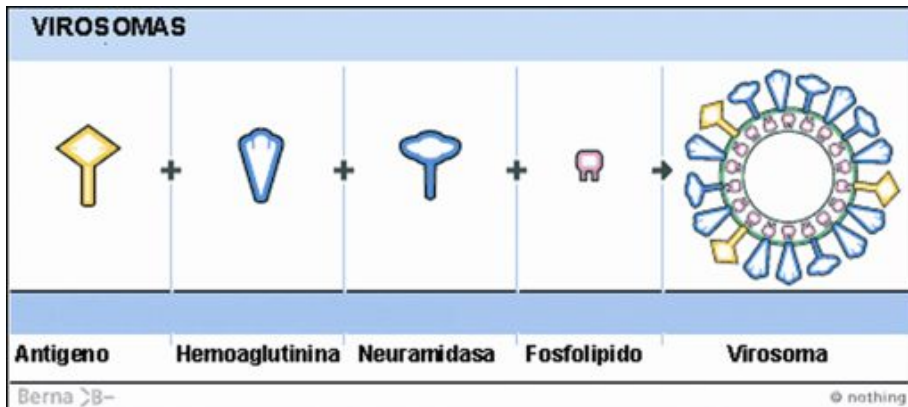


Figura 12: Diferentes componentes que intervienen en la composición de un virosoma

En el campo de las vacunas se están desarrollando diversos ensayos clínicos con vacunas preparadas según la tecnología virosomal, tal como se recoge en la Tabla 4

Una perspectiva particularmente interesante para la aplicación de los virosomas es su utilización como vehículos de liberación de genes en vacunas de ADN y RNA. Las vacunas basadas en genes tienen muchas ventajas potenciales puesto que el antígeno es producido por las células del huesped, pudiendo inducir tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células.

Proyecto	Preclínica	Fase Clínica			Terminado	Disponible
		I	II	III		
2 dosis Hep B						
Fiebre amarilla					2003	2006
P. Aeruginosa					2006	2007
Dif+Tetan+ Pert.+ Hep B					2005	2006
Dif+ Tetan+ Pert.+Hemofil					2005	2006
Mab Pseudom.		2005				
Diarrea viajero		2005				

Tabla 4: Principales proyectos de vacunas incluidas en virosomas

Otro uso potencial de los virosomas sería la liberación de fármacos en una diana específica. En éste sentido la firma Berna Biotech está utilizando anticuerpos monoclonales y antígenos asociados a tumores para dirigir los virosomas, que contienen antineoplásicos, directamente a las células cancerosas (77).

Vacunas de ADN: La inmunización directa con ADN presenta el problema de que gran parte del plásmido es degradado por las nucleasas del fluido intersticial y solo una pequeña parte es captado por los miocitos.

La inclusión de un plásmido de ADN en liposomas catiónicos permite su protección y que sea rápidamente captado por las células presentadoras de antígeno. Experiencias realizadas en ratas con el plásmido que codifica la región S del antígeno superficial de la hepatitis B muestran una gran elevación no solo de la respuesta humoral (IgG1) sino también de la respuesta celular (78). En base a éstos hechos experimentales se ha propuesto el mecanismo de acción que se recoge en la Figura 13.

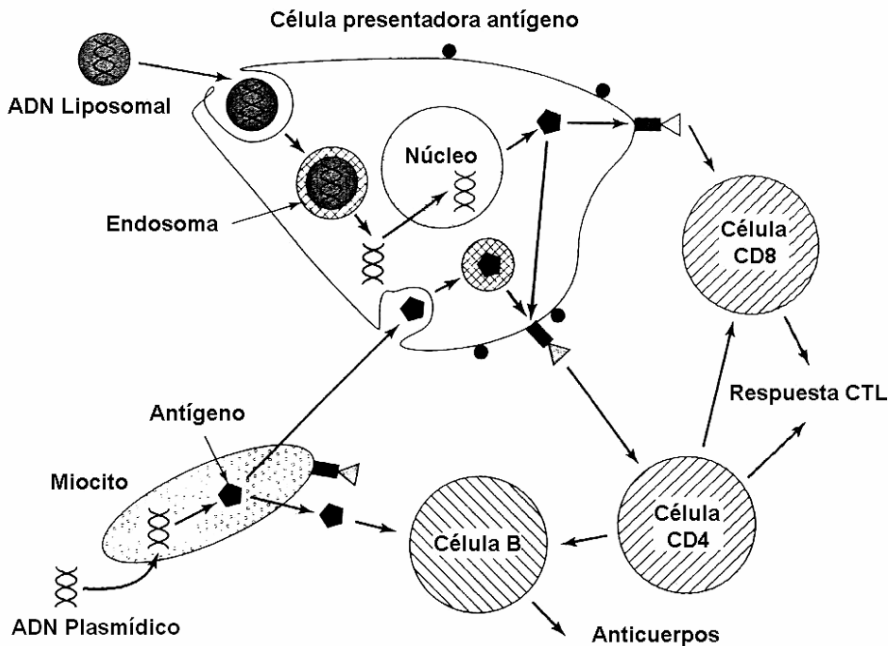


Figura 13: Representación del mecanismo de la inmunización con ADN. El ADN es capturado por un pequeño número de miocitos tras una administración i.m. el cual es transfectado vía episomal. El antígeno producido es liberado para que interaccione con células presentadoras de antígeno (APC). En contraste, el plásmido ADN incluido en liposomas interacciona directamente con células APC vía endocitosis.

La optimización de vacunas de ADN en liposomas está recibiendo un importante impulso con el uso de agentes inmunoestimulantes (plásmidos que codifican por ejemplo interleukina 2) o recubriendo los liposomas con moléculas ligando de células presentadoras de antígeno.

Otras aplicaciones: Desde hace varios años ha recibido particular atención la utilización de liposomas como vehículos para radioisótopos (γ -escintigrafía) y agentes de contraste (TAC y RMN). El fundamento del empleo de éstos nanosistemas reside en que las células tumorales poseen una actividad fagocitaria menor que los tejidos normales por lo que hay una acumulación del contraste en éstos. Por otra parte áreas de inflamación, por ejemplo en artritis, dan también señal positiva que puede ser incrementada con el empleo del contraste incluido en liposomas.

Los liposomas tienden a ser captados por el sistema reticuloendotelial por lo que también pueden ser empleados para la detección de tumores hepatoesplénicos y metástasis mediante TAC o RMN.

Los liposomas de larga semivida plasmática también presentan interés como vehículos de contrastes vasculares para detectar lesiones ateroscleróticas, shunts intravasculares, etc. Presentan igualmente interés los denominados inmunoliposomas específicos para el citoesqueleto conteniendo anticuerpos antimiosina en infarto experimental de miocardio (79). Estos inmunoliposomas se fusionan con las células dañadas y constituyen un excelente vehículo para la liberación de fármacos o ADN a células hipóxicas (Figura 14)

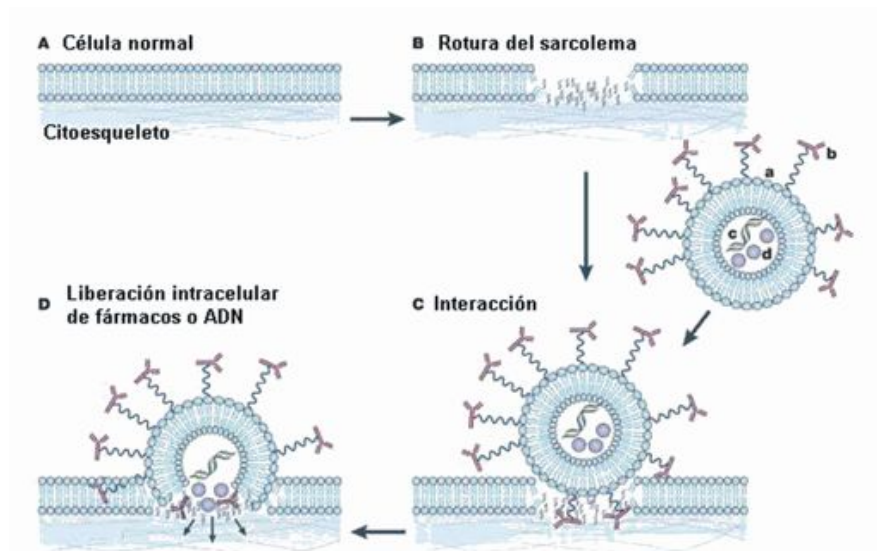


Figura 14: Liberación de fármacos o ADN a partir de inmunoliposomas específicos para el citoesqueleto. A) liposoma modificado con anticuerpos monoclonales específicos para el citoesqueleto b) con fármaco o ADN pueden reconocer lugares con rotura del sarcolema B), fijarse en éstas zonas, vía interacción específica con el antígeno del citoesqueleto C) y, tras su fusión con la célula, liberar fármaco o ADN al citoplasma celular. (Torchlin: Nature Reviews 2005)

Es de destacar las buenas perspectivas que ofrecen los resultados de fijar en liposomas cadenas de ADN con copias sanas del gen CFTR y

realizar su administración en forma de aerosol nasal en el tratamiento de la fibrosis quística. Aunque los resultados obtenidos proceden de cortos ensayos clínicos, sin embargo resultan esperanzadores ya que son tan buenos como los obtenidos con vectores virales si bien la intensidad de la expresión genética correcta en los pulmones enfermos, y el tiempo que pueda durar esa expresión, sigue preocupando a los investigadores ya que se trata de corregir la enfermedad de una forma eficaz y duradera.

Como conclusión podemos decir que los liposomas constituyen los sistemas coloidales mas ampliamente estudiados con finalidad clínica, especialmente para fármacos antineoplásicos, antibacterianos y material genético. Los problemas involucrados en el desarrollo de formulaciones conteniendo fármacos o vectores de terapia génica han sido progresivamente resueltos con la utilización de nuevas tecnologías en su preparación y la incorporación de nuevos lípidos.

Aunque aun persisten grandes problemas para alcanzar el potencial terapéutico que ofrecen los liposomas existe una corriente de opinión generalizada que los liposomas, y particularmente los llamados smart (o dirigidos externamente) como los liposomas magnéticos o liposomas conteniendo agentes fotosensibilizantes, como derivados de la benzoporfirina, prestaran un gran beneficio en la terapéutica anticancerosa, liberación de vacunas, proteínas y ADN.

2. MICELAS POLIMERICAS

Estos sistemas pueden ser utilizados para la solubilización, estabilización y liberación de numerosos fármacos de mayor o menor complejidad estructural. Las propiedades funcionales de las micelas formadas a partir de bloques de copolímeros anfifílicos las convierten en sistemas ideales para la encapsulación y liberación de fármacos de carácter hidrófobo. Los bloques de copolímeros anfifílicos estan constituidos por al menos dos regiones de naturaleza química diferente que sufren una separación de fases como consecuencia de la asociación de las cadenas en solventes que selectivamente disuelven uno de los bloques. Durante el proceso de micelización los bloques hidrofóbicos se asocian, para formar un núcleo, en el que se asocia el fármaco, mientras que los segmentos hidrofílicos se sitúan entre el núcleo y el medio acuoso externo.

Existe un gran interés en el uso de las micelas poliméricas como portadoras de fármacos como lo demuestran Adams (80) y Duncan (81) en sus excelentes revisiones en las que señalan los tres grandes grupos de copolímeros que forman el núcleo hidrofóbico: polímeros de polioxietileno con poli L-aminoácidos, con poliésteres o con polioxipropileno.

Cuatro son los aspectos que interesa destacar de éstos sistemas poliméricos

En primer lugar, la concentración crítica micelar para los bloques de copolímeros es del orden de 10×10^{-6} y 10×10^{-7} M (82) mientras que para los tensoactivos de bajo peso molecular se sitúa entre 10×10^{-3} y 10×10^{-4} lo que se traduce en una mayor estabilidad para las primeras y por tanto una mayor estabilidad al ser diluidas (83) lo cual tiene importancia en un sistema que se va a administrar por vía parenteral y en el que interesa que el fármaco no se libere prematuramente.

En segundo lugar otro aspecto interesante de éstas micelas es que no son captadas por el sistema reticuloendotelial ya que la parte polar impide la interacción del núcleo hidrofóbico con componentes plasmáticos pudiéndose modificar el tiempo de circulación del agente terapéutico en función de la longitud de la cadena de oxido de polietileno. En éste sentido los polímeros de polioxietilenglicol han sido ampliamente reconocidos por su capacidad para minimizar la adsorción de proteínas a las superficies debido a la mínima energía libre interfacial con el agua, elevada hidrosolubilidad, elevada movilidad y amplio volumen de exclusión (84; 85) por lo que éstos polímeros son ampliamente utilizados para mejorar la biocompatibilidad de numerosas sustancias extrañas.

En tercer lugar las micelas poliméricas tienen un peso molecular del orden de 10×10^6 lo que impide su aclaramiento renal pero por su tamaño inferior a 100 nm (habitualmente entre 20-50 nm) pueden pasar a través de los capilares de los tejidos tumorales en los que además está disminuido el drenaje linfático lo cual permite una orientación selectiva pasiva de los agentes antitumorales.

Finalmente, una ventaja asociada al pequeño tamaño de las micelas poliméricas es la relativamente sencilla esterilización por filtración.

Los métodos más frecuentemente utilizados para la inclusión de fármacos son la disolución directa, diálisis, emulsión O/W, conjugación química, complejación y diversos métodos de evaporación del disolvente siendo los dos primeros los más utilizados para fármacos razonadamente hidrosolubles o hidroinsolubles; por otra parte, dependiendo del método utilizado, la carga del fármaco se puede realizar durante la micelización o posteriormente

Las micelas poliméricas basadas en bloques poliméricos de polioxido de etileno y poli-L-aminoácidos son bastante versátiles porque permiten realizar modificaciones químicas en el polímero que forma el núcleo y con ello facilitar la carga del fármaco bien por un procedimiento físico o químico. Dentro de éste tipo de polímeros han sido ampliamente utilizados aquellos que contienen poli-L-aspartico ya que, a través del grupo carboxilo, es posible realizar una conjugación con el fármaco el cual queda en forma de pro-fármaco que va siendo liberado por hidrólisis inespecífica o enzimática. Este procedimiento ha sido utilizado para la liberación de fármacos citostáticos de elevada toxicidad como doxorubicina (86), metotrexato (87) y camptotecina (88)

Dentro de éste tipo de micelas podemos incluir el reciente estudio de Bae y col (89) en el que utiliza micelas de bloques de copolímeros multifuncionales a base de folato-polietilenglicol y poli-aspartato hidrazona adriamicina (Figura 15) que permite una endocitosis mediada por los receptores folato sobreexpresados en muchas células tumorales y una lábil unión de la adriamicina que se libera por efecto del pH (5-6) existente en el endosoma. En conclusión, las micelas poliméricas con unión folato se comportan como un excelente nanosistema inteligente para la liberación de fármacos en el interior de células a través de una endocitosis selectiva y puede ser utilizada para otros citostáticos diferentes del utilizado en éste trabajo.

Otro aminoácido empleado en la formación de bloques de copolímeros es la L-lisina con la que es posible preparar complejos poliiónicos micelares como por ejemplo mezclando polímeros de polioxido de etileno- poli L-aspartico (cargado negativamente) con

polímeros de polioxietileno-poli L-lisina (cargado positivamente). Igualmente es posible una interacción iónica entre el fármaco y el polímero, tal como lo revelan los resultados obtenidos entre el copolímero polioxietileno-poli L-lisina y oligodesoxinucleótidos antisentido (90) o enzimas (91).

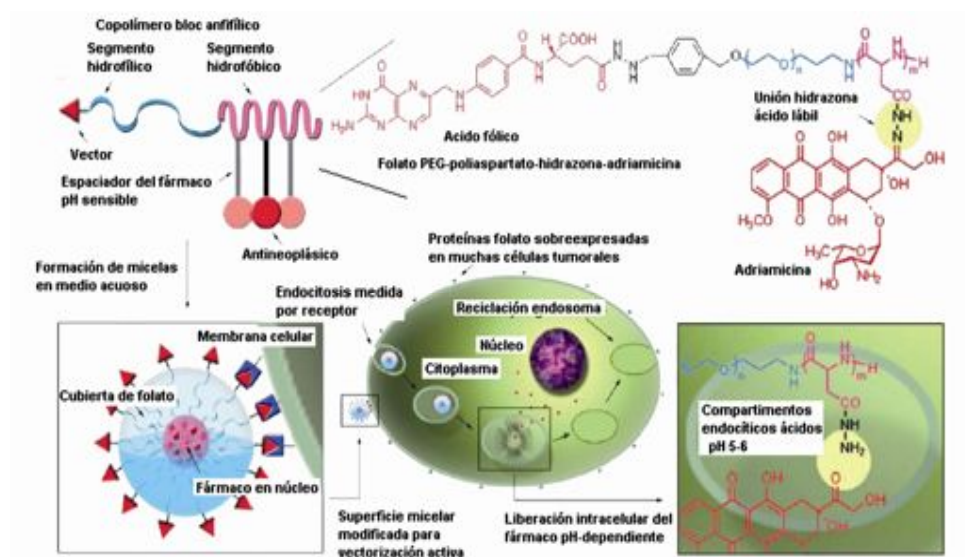


Figura 15: Esquema de la actuación de micelas poliméricas vectorizadas constituidas por el polímero fólico-poli (etilenglicol) poli (aspartato-hidrazona-adriamicina)

Un polímero de polioxido de etileno con poli-L-glutámico ha sido empleado para obtener micelas conteniendo cisplatino (92). Las micelas presentan un tamaño del orden de 30 nm, con elevada uniformidad de tamaño, muestran un elevado tiempo de circulación plasmático y una acumulación muy notable en tejido tumoral en ratones.

Los copolímeros del polioxido de etileno con poli- aminoácidos son biodegradables y relativamente no tóxicos ya que las uniones amida sufren una hidrólisis bien enzimática o hidrolítica originando los correspondientes L-aminoácidos. Actualmente se encuentra en ensayo clínico un conjugado micelar de la doxorubicina con polioxietileno-poliaspartico (93).

Otro importante grupo de copolímeros son los constituidos por polioxido de etileno y poliésteres como poliláctico, poliglicólico, polilactico-glicólico y poliepsiloncaprolactona. Si bien éstos polímeros son menos adecuados para modificaciones químicas que los poli-aminoácidos, sin embargo presentan una constatada ausencia de toxicidad en humanos; por otra parte los poliésteres son biodegradables por un proceso hidrolítico no específico.

El metoxipropiletilenglicol-poli D-L- láctico ha sido utilizado para, a través de la micelización, hidrosolubilizar elevadas cantidades de paclitaxel (94) y doxorubicina (95). También es posible, con éste mismo polímero, fijar en la superficie de las micelas restos de azúcares y ello abre la posibilidad de una orientación activa vía glicoreceptores.

Otro campo importante de utilización farmacéutica de éstos polímeros es la utilización de polímeros tribloc, como por ejemplo del tipo polióxido de etileno-poliglicólico-polióxido de etileno que son biodegradables y termosensibles de tal forma que el sistema puede ser inyectado como solución y pasar a gel a la temperatura del organismo. Este tipo de sistemas ha sido propuesto para la liberación de proteínas (96) (97)

Finalmente otro importante grupo de copolímeros está constituido por poli (óxido de etileno) bloque- poli (óxido de propileno) bloque poli (óxido de etileno) , conocidos como poloxamer o Pluronic y que generalmente se expresan como PEO_m/2- b- PPO_n- b- POE_n/2 en donde m y n son el número medio total de unidades de POE y PPO que se repiten. A bajas concentraciones estos polímeros no son citotóxicos y existe una gran variedad comercial que se diferencian en el peso molecular medio y las relaciones de copolímeros que a su vez condicionan el valor de la concentración crítica micelar y el reparto de las moléculas hidrofóbicas en las micelas.

Los poloxamer han demostrado poder para inhibir la acción del grupo de proteínas conocidas como glicoproteína P cuya sobreexpresión en células cancerosas reduce la acumulación de citostáticos en tejidos cancerosos (98; 99) habiéndose señalado que éste efecto está ligado a una deplección en los niveles de ATP. Ello ha dado lugar al desarrollo de diversas formulaciones conteniendo citostáticos como doxorubicina

(100), vimblastina mitomicina , cisplatino (101) , paclitaxel y etopósido (102).

El uso concomitante de micelas de poloxamer y ultrasonidos se ha demostrado como un método para controlar y orientar diversos fármacos. Marin y col (103) han aplicado doxorubicina en micelas de poloxamer y después de conseguir una acumulación pasiva se mejora la liberación del citostático por medio de ultrasonidos.

Los copolímeros bloque están comenzando a jugar un importante papel en terapia génica y constituyen otra alternativa frente a los vectores víricos. Hasta el momento actual el interés de éstos sistemas se ha centrado en las propiedades del copolímero que forma el núcleo micelar pero cada vez se hacen mayores esfuerzos para obtener copolímeros que se sitúan en el exterior y que respondan a cambios de pH o permitan un reconocimiento de proteínas. El desarrollo de nuevos polímeros seguramente mejorará la flexibilidad y el potencial de los sistemas de liberación basados en micelas poliméricas.

3. NANOPARTICULAS

A finales de los años 1970, debido a los problemas que presentaban los liposomas como la baja estabilidad y baja eficiencia en la incorporación de fármacos, surgieron como alternativa las nanopartículas.

Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas con un tamaño de 10 a varios cientos de nanómetros constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las primeras tienen una estructura tipo matriz polimérica, en la que se encuentra dispersado el principio activo, mientras que las segundas poseen un núcleo de carácter oleoso, que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de éstos sistemas el fármaco también puede ser adsorbido en la superficie del sistema nanoparticular. De acuerdo con lo expuesto, la estructura general y la localización del fármaco en las nanopartículas, se recoge en la Figura 16

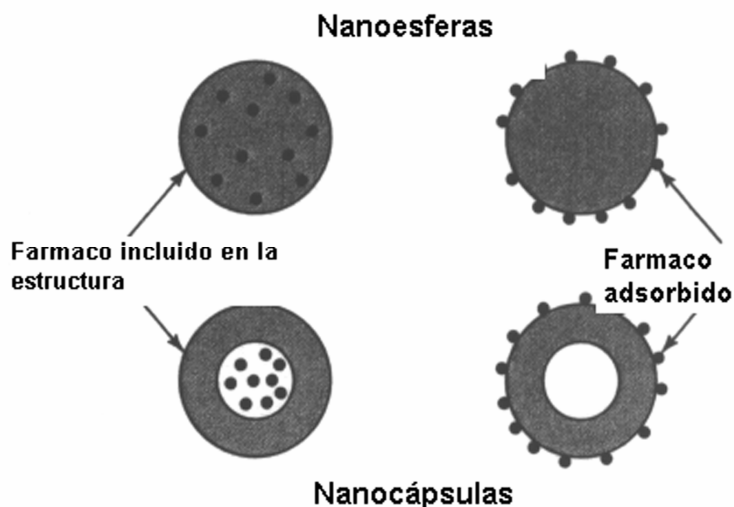


Figura 16: Diversos tipos de encapsulación de un fármaco en nanopartículas.

Los métodos de preparación de nanopartículas son actualmente muy numerosos pudiendo agruparlos en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero. La elección del método de preparación depende de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad del principio activo que se desea incorporar. Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas para el principio activo son fundamentales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica. De éstas consideraciones es evidente que la formulación y método de preparación a utilizar requiera una definición inicial precisa de las necesidades y objetivos que se desean alcanzar.

Puesto que las nanopartículas son sistemas que se van a utilizar como formas de dosificación en humanos es necesario que cumplan, entre otros requerimientos: ausencia de impurezas potencialmente tóxicas, fácil de conservar y administrar y esterilidad si se van a utilizar por vía parenteral.

Dependiendo del método de preparación se pueden encontrar en la suspensión de nanopartículas diversas impurezas como disolventes orgánicos, monómeros, tensoactivos, estabilizadores y agregados poliméricos que es preciso eliminar. Actualmente el procedimiento más utilizado es la microfiltración tangencial (poro de la membrana: 100 nm) ya que, además de la eliminación de impurezas, es rápida y fácil de trasladar a escala industrial sin que se produzca modificación del tamaño de la nanopartícula.

La conservación estable de éstos sistemas se logra mediante la liofilización siendo necesaria la incorporación de crioprotectores como la trehalosa que impidan la agregación de las nanopartículas durante la liofilización, hecho que se presenta frecuentemente en las nanocápsulas o con ciertos polímeros.

Finalmente la esterilización de las nanopartículas es un aspecto en general poco estudiado si bien se cita con frecuencia la esterilización final con radiaciones gamma a las cuales son sensibles algunos de los polímeros más empleados en la elaboración de nanopartículas. Recientemente se ha propuesto aplicar la tecnología de compartimentos aislantes para el proceso de obtención de nanopartículas (104).

La albúmina, como componente de nanopartículas, ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores pero ha adquirido especial relevancia al ser las primeras nanopartículas, aprobadas por la FDA, conteniendo paclitaxel. Estas nanopartículas, desarrolladas según la tecnología de la American Biosciences, pueden pasar a través del epitelio endotelial de los vasos de los tumores vía transporte mediado por receptores de la albumina y no contienen los disolventes utilizados para disolver el paclitaxel. Ello permite que la infusión dure sobre 30 minutos en lugar del largo tiempo que se utiliza con la formulación convencional; por otra parte se pueden utilizar equipos de perfusión standard en lugar de los equipos especiales que se requieren para administrar el paclitaxel. La FDA aprobó Abraxane (partículas de paclitaxel unido a albúmina para suspensión inyectable) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

Las nanopartículas biodegradables preparadas a partir de poliésteres han ido ganando un creciente interés en el campo de la liberación controlada de biomoléculas. De entre los polímeros son los del

poliláctico, poliglicólico y sus copolímeros los mas utilizados por su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad y numerosos estudios en los que se han relacionado sus propiedades con aspectos de la formulación y liberación de los numerosos principios activos que han sido encapsulados (105; 106).

Por otra parte son bien conocidas las interacciones que se pueden producir entre numerosos principios activos y los grupos carboxilo terminales de éstos polímeros y el mayor número de éstos que se producen durante el proceso hidrolítico que afectan a los poliésteres y que conducen a la formación de oligómeros y monómeros ácidos (107).

Diversos autores (108; 109; 110; 111) han señalado que la coencapsulación con excipientes protectores puede constituir una alternativa para disminuir la interacción entre el fármaco y el polímero así como neutralizar la acidificación del medio que se produce durante su degradación. Entre las diversas alternativas destacan la inclusión de copolímeros bloque a base de polioxietileno y polioxipropileno ya que aumentan de forma significativa la estabilidad y la eficiencia de encapsulación de proteínas como seroalbumina, interferon alfa y toxoide tetánico (112; 113; 114).

Según el procedimiento seguido en la preparación de éstos nanosistemas se pueden tener las diferentes estructuras que se recogen en la Figura 17

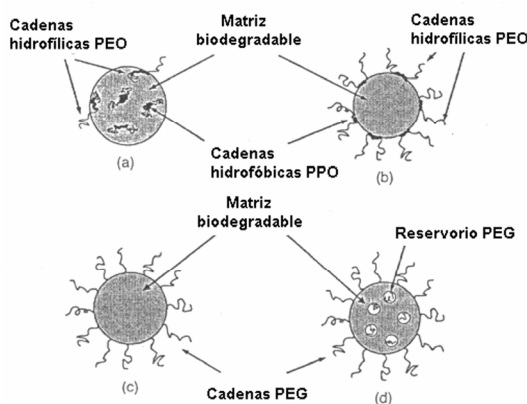


Figura 17: Diversas estructuras de nanopartículas que se pueden obtener a partir de sistemas constituidos por poliésteres y poloxamer/poloxaminas

En el primer caso se trata de una adsorción del poloxamer o poloxamina bien durante el proceso de formación de las nanopartículas (A) o bien después de la formación de las mismas (B). En el segundo caso tiene lugar una modificación química del polímero formador de la matriz (poliláctico o poliláctico-glicólico) con una unión covalente con el óxido de polietileno pudiéndose producir, según el método de preparación, bien una orientación de las cadenas de polioxietileno (C) o la formación de pequeños reservorios en el interior de las nanopartículas (D).

De los estudios realizados con nanopartículas, marcadas con isótopos, se ha podido concluir que la cubierta con poloxamer o poloxaminas puede modificar la biodistribución del vehículo; así, por ejemplo, se ha observado que algunos poloxamer y poloxaminas incrementan el drenaje linfático y la captura de partículas por los macrófagos de los nodos linfáticos regionales (115; 116). Este efecto sería ventajoso en el diseño de vehículos para vacunas y fármacos cuya diana se encuentra en el sistema linfático o inmune.

Para la obtención de nanopartículas a base poliláctico-glicólico y poloxamer y poloxaminas se ha propuesto una modificación del método de emulsificación-difusión del solvente, utilizando simplemente agitación por medio de vortex en el proceso de emulsificación. Ello permite la encapsulación de ADN plasmídico, en condiciones excepcionalmente suaves, así como proteínas o fármacos lipofílicos de bajo peso molecular (117).

Tomando como modelo de proteína la insulina bovina se encuentra que puede ser encapsulada con una eficiencia del orden del 40% cuando se trata de poloxamer o poloxaminas con un HLB de 30 mientras que no es posible obtener nanopartículas de insulina cuando solo se utiliza poliláctico-glicólico, lo cual confirma que la presencia de derivados de PEO es esencial para la formación de las nanoestructuras.

En la Figura 18 se muestra el perfil de liberación” in vitro” de insulina (expresada como % del contenido de insulina en el sistema) a partir de nanopartículas de poliláctico-glicólico: poloxamina 908 en proporción 50:50. Se puede observar la ausencia de una liberación inmediata, tan frecuente en éstos sistemas conteniendo péptidos y

proteínas, y una liberación constante, muy próxima a un orden 0 que se mantiene durante 14 días.

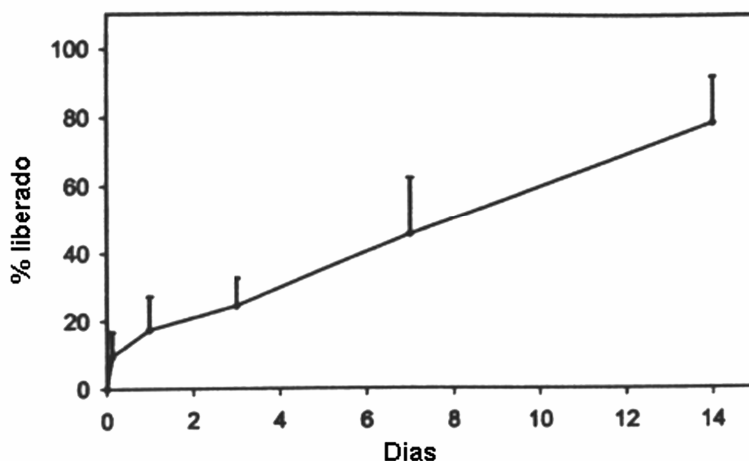


Figura 18: Perfil de liberación de insulina a partir de nanopartículas a base de PLGA: Tetronic 908 (50:50)

Haciendo uso de las mismas nanopartículas se ha podido encapsular tanto el plásmido ADN pEGFP-CI (que codifica proteína fluorescente verde con promotor CMV) (117) y plásmido ADN pCMV- β -Gal. (118).

En la Figura 19 se observa que el plásmido ADN pEGFP se encuentra en las dos formas biológicamente activas: superhelicoidal (aproximadamente un 60%) y circular abierta (aproximadamente 40%). Durante el proceso de liberación de 2 semanas se siguen observando las dos formas y no se observa la aparición de la forma lineal si bien se produce una pequeña conversión de la forma superhelicoidal a circular abierta. Este hecho demuestra que los derivados de PEO previenen cambios estructurales del plásmido encapsulado que si se producen cuando se utilizan nanopartículas de poliláctico-glicólico.

Utilizando un similar sistema nanoparticular, pero conteniendo plásmido ADN pCMV- β Gal, se ha observado que, tras su administración

por vía nasal, se produce una eficiente interacción con la mucosa nasal que no alcanza la región pulmonar.

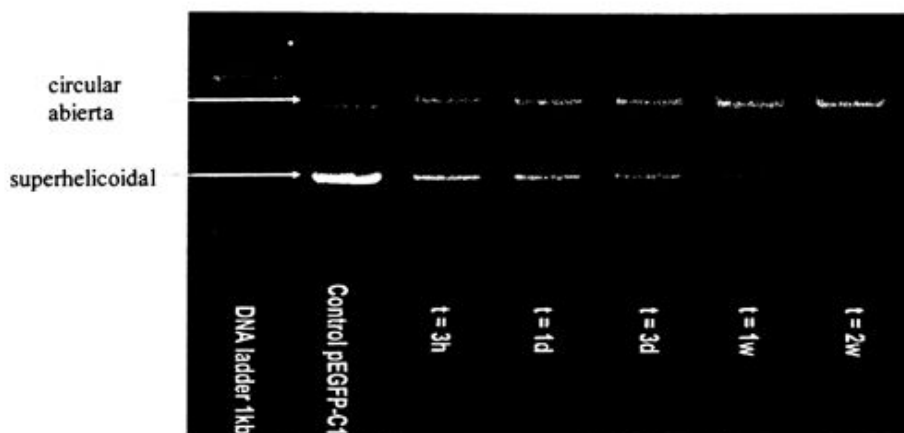


Figura 19: Análisis estructural del plásmido pEGFP liberado a diferentes tiempos a partir de nanopartículas elaboradas a base de una mezcla PLGA: Pluronic L 121

Al determinar la respuesta inmune obtenida se observa que la β galactosidasa produce niveles de anticuerpos mas altos cuando el plásmido se administra en forma de sistema nanoparticular (Figura 20). Los máximos niveles de IgG se alcanzaron a las cuatro semanas de la administración y después descienden hasta hacerse indetectables a partir de las ocho semanas. En el caso particular de la formulación con poloxamer F68 el máximo de IgG es tres veces mayor a las cuatro semanas y dos veces mayor a las seis semanas.

En conclusión, los resultados obtenidos en el estudio de inmunización, ponen de manifiesto el potencial de éstas nanoestructuras basadas en mezclas de PLGA con derivados de polióxido de etileno como transportadores de vacunas genéticas a través de superficies mucosas. Al mismo tiempo es de señalar que el tipo de poloxamer/poloxamina incorporado a la nanoestructura tiene una importancia crítica en la eficacia del sistema con respecto a su capacidad para generar respuestas inmunes (119)

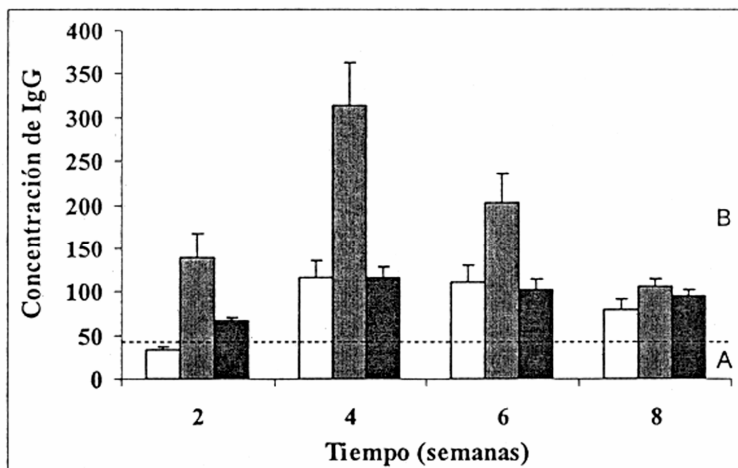


Figura 20: Niveles séricos de IgG tras la administración nasal del plásmido pCMV- β Gal. (□) solo; encapsulado en nanopartículas de PLGA:Pluronic F68 (■) y en PLGA:Tetronic 904 (■). Región A: Nivel IgG no específico. Región B: anti β Gal IgG específico.

QUITOSANO- El quitosano (Figura 21), polisacárido lineal catiónico obtenido por deacetilación parcial alcalina, y sus derivados constituyen unos polímeros frecuentemente utilizados en Tecnología Farmacéutica bien como promotores de la absorción de fármacos a través de diversas mucosas como la nasal, pulmonar y también como vehículos no virales para la liberación de material genético y vacunas.

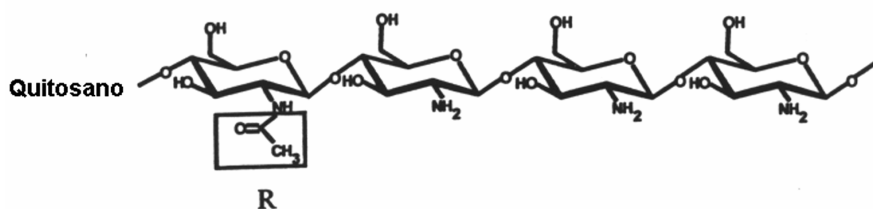


Figura 21: Estructura química del quitosano (1->4) 2 amino 2 deoxi- β glucano

El creciente interés del quitosano y sus derivados se basa en sus particulares características entre las cuales se deben señalar:

- Las propiedades fisicoquímicas del quitosano son diferentes en función del peso molecular (entre 50 y 2.000 kDa) y el grado de N deacetilación (entre 40 y 98%) lo cual confiere una elevada versatilidad para su uso.
- Los quitosanos, con excepción de los de elevado peso molecular, no son tóxicos ya que por la acción de las lisozimas son degradados a aminoazúcares.
- A pH ácido la función amina es protonizada obteniéndose un polímero con una elevada densidad de carga y que forma complejos estables con DNA en los que éste es protegido frente a la nucleasas.
- La función amino puede ser metilada y así se ha propuesto como vector no vírico el clorhidrato del trimetilquitosano. Por otra parte, a través del grupo hidroxilo se pueden fijar péptidos y sacáridos para conseguir una orientación selectiva o una endocitosis mediada por receptor (120).
- El quitosano interacciona con las membranas celulares no solo por fuerzas electrostáticas sino también a través de los carbohidratos que componen las membranas celulares provocando una perturbación en la estructura de la bicapa (121)

La obtención de nanoesferas de quitosano-ADN puede realizarse por un método de coacervación compleja en el que se utiliza el sulfato sódico como agente de desolvatación (122). Estas nanoesferas se conservan en medio acuoso durante tres meses cuando se realiza la reticulación del quitosano, mientras que solo permanecen estables algunas horas si no se lleva a cabo ésta fase (123). Si se liofilizan las nanoesferas de quitosano-ADN se mantiene la capacidad de transfección durante un tiempo de 4 semanas (124).

Otra propuesta es la encapsulación del ADN en estructuras nanoparticulares obtenidas mediante gelificación iónica, empleando un agente reticulante como el tripolifosfato. Estas nanoestructuras ofrecen considerables ventajas entre las que se pueden señalar:

- Alta reproducibilidad y distribución de tamaños mas homogénea
- Liberación controlada
- Posibilidad de coencapsular (sin modificaciones químicas del sistema) el ADN con otras moléculas que podrían facilitar su transporte en el organismo o su internalización celular/nuclear (125)

Diversos estudios de transfección han sido realizados para demostrar la capacidad de condensar y liberar ADN en células Cos-1 a partir de nanosferas de quitosano con un tamaño de 100 a 200 nm habiéndose observado que los mejores resultados se obtienen cuando el polímero tiene un peso molecular elevado (126) si bien estudios posteriores, en los que se ha investigado ampliamente el potencial del quitosano como vector genético, han puesto de manifiesto la influencia del grado de acetilación y del peso molecular.

Como tendencia general, se puede concluir:

- Un bajo grado de acetilación facilita la interacción del quitosano con el ADN, dando lugar a la formación de complejos nanométricos (127)
- El bajo peso molecular (cuando se utiliza quitosano de pureza muy elevada) lleva asociada una menor toxicidad y favorece además la disociación intracelular del complejo, mejorando así la eficiencia de transfección del sistema (128)

El quitosano se ha revelado como un excelente vehículo para la administración de macromoléculas a través de mucosas, particularmente la oral y nasal. Ello se debe no solo a su propiedad promotora de la absorción sino también a sus propiedades bioadhesivas. En particular destacan los trabajos realizados para la administración de vacunas genéticas por vía nasal ya que no solo se obtiene una respuesta humoral y celular sino también una inmunización a nivel de la mucosa en la que ésta constituye la puerta de entrada de patógenos.

El método mas frecuente de utilización del complejo quitosano-ADN son las nanopartículas preparadas por un método de complejación-coacervación que permite obtener nanosistemas con carga superficial positiva a pH inferior a 6 y que protegen de forma eficaz el ADN frente a la acción de las nucleasas. La administración a ratones por vía nasal del

plásmido que expresa epitopos del virus sincitial respiratorio incorporado a nanoesferas de quitosano produce una elevación importante de IgG específicas, altos títulos de IgA, niveles de interferon α en los pulmones y una fuerte respuesta CTL (129)

El quitosano permite una liberación controlada por lo que es presumible mantener una duradera expresión de la proteína. Por otra parte, los derivados del quitosano también se presentan como vehículos adecuados para la administración de vacunas genéticas vía mucosas si bien es necesario establecer en cada caso cuando se inicia una inmunidad humoral o celular y que citoquinas están implicadas en una determinada vacuna.

La administración de macromoléculas por vía nasal también es objeto de interés desde hace algunos años lo que ha llevado a que formulaciones conteniendo macromoléculas como la insulina, hormona de crecimiento, leuprolide, paratohormona se encuentren en distintas fases de investigación clínica (130). Recientemente se ha propuesto un método para la preparación de nanocápsulas oleosas recubiertas con quitosano como vehículo para estabilizar macromoléculas y favorecer la absorción nasal (131). El método se basa en una técnica de desplazamiento del solvente para lo que se disuelven lecitina y Miglyol 812 en acetona y ésta fase se somete a una agitación moderada añadiéndose una fase acuosa que contiene el péptido, poloxamer 188 y quitosano en forma de cloruro. Tras la evaporación del solvente se concentra la suspensión a vacío.

En la Figura 22 se muestran las áreas de las curvas de calcemia-tiempo en ratas tras la administración de 15 IU/Kg de calcitonina de salmón en forma de solución acuosa, nanoemulsión y nanocápsulas recubiertas con quitosano: Se observa que se produce un aumento de 1,5 veces del área de la curva cuando la calcitonina va incorporada en nanocápsulas lo que indica un efecto promotor del quitosano en la absorción nasal de éste péptido.

La vía oral sigue siendo la vía de elección para la administración de fármacos pero todavía no es factible su utilización cuando se trata de fármacos peptídicos o proteicos, debido a las condiciones fisiológicas existentes en el tracto digestivo. En la última década, el esfuerzo realizado en el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan la

administración de péptidos y proteínas por vía oral, ha dado lugar a resultados muy prometedores.

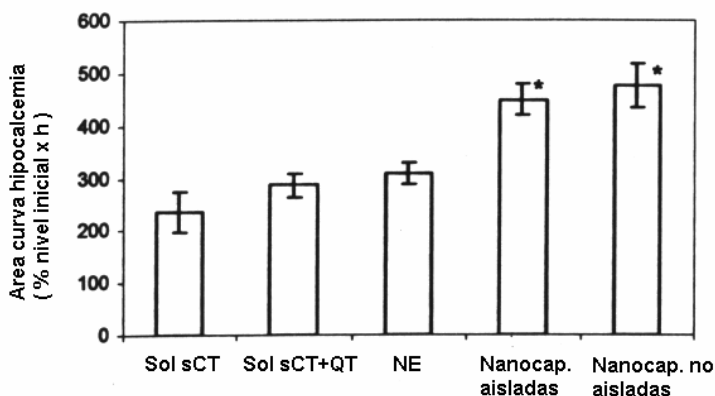


Figura 22: Hipocalcemia producida por la administración nasal de calcitonina en forma de solución, nanoemulsión y nanocápsulas recubiertas con quitosano.

Entre los diversos nanosistemas estudiados destacan aquellos en los que interviene el quitosano o éste asociado al glucomanano el cual aumenta la estabilidad de las nanopartículas en los fluidos gastrointestinales y facilita su interacción con los receptores de manosa existentes en el epitelio intestinal (132). En otro trabajo se compara la absorción intestinal, en perros beagle, de nanoesferas de ciclosporina A con la microemulsión de ciclosporina A, encontrándose un aumento en la biodisponibilidad del péptido cuando se incorpora a nanoesferas (133). Finalmente podemos señalar el trabajo de Prego y col (130) en el que, empleando la calcitonina de salmón como péptido, el efecto hipocalcémico es mas intenso y más duradero cuando se utiliza una formulación de nanocápsulas recubiertas con quitosano, tal como se observa en la Figura 23

Como conclusión podemos decir que los nanosistemas a base quitosano o sus derivados permiten incrementar la absorción oral de péptidos por un mecanismo de bioadhesión, por la modificación de las uniones tight de las células epiteliales del intestino y por una protección frente a la degradación enzimática.

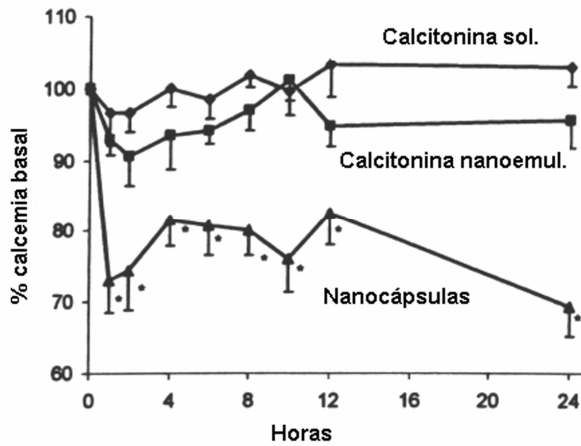


Figura 23: Absorción oral de calcitonina incluida en nanocápsulas de quitosano

POLILISINAS Y DERIVADOS: El hecho de que los péptidos que condensan el ADN en la naturaleza (histonas o péptidos virales) contengan un alto porcentaje de aminoácidos básicos ha sugerido la utilización de moléculas peptídicas como vectores en terapia génica. Entre ellos, el mas utilizado es la poli L lisina (Figura 24)

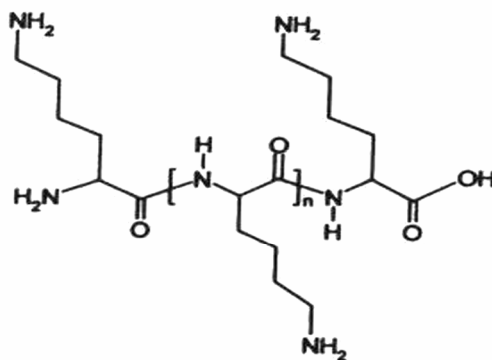


Figura 24: Estructura química de las polilisinas

Debido a su elevada citotoxicidad y su carácter no biodegradable, en los últimos años las investigaciones sobre éstos polímeros han ido

dirigidas al desarrollo de polímeros basados en la despolimerización y la pegilación de la poli L lisina (134) o en su conjugación con polímeros biodegradables como polisacáridos o poliésteres (135).

Otro objetivo de las modificaciones químicas de la poli L lisina ha sido mejorar la eficiencia de transfección del complejo PLL-ADN. Así por ejemplo, se han sintetizado una amplia variedad de derivados de la PLL que poseen ligandos para favorecer su transporte a las células diana, aumentando la endocitosis del complejo por su unión a receptores específicos siendo los mas eficientes, en ésta categoría, los conjugados: PLL-transferrina, PLL-folato y PLL-anticuerpo destinados a facilitar el acceso a células cancerígenas (136; 137) o bien PLL-asialooromucoide y PLL-lactosa-galactosa destinadas a conseguir la vehiculización hacia las células hepáticas. También existen sistemas combinados como los conjugados PLL-PEG-lactosa, PLL-EGF-folato, PLL-PEG-AWGB (péptido para la unión al endotelio arterial) o el sistema terplex que consiste en estearil-PLL y una proteína de baja densidad (138).

POLIETILENIMINA: Está considerada como uno de los vectores mas eficientes en terapia génica tanto in vitro como in vivo (Figura 25). Debido al elevado número de átomos de nitrógeno protonizables, la cadena polimérica posee una alta densidad de cargas positivas, lo que permite la formación de complejos de tamaño muy reducido (139)

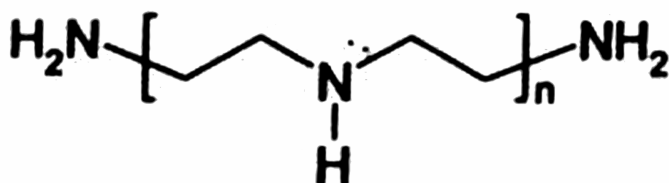


Figura 25: Estructura química de las polietileniminas

La presencia de grupos protonizables en la estructura polimérica también tiene importancia en el proceso de internalización celular y su capacidad amortiguadora de los cambios de pH confiere protección al plásmido y posibilita su escape de los endolisosomas tras su internalización (140).

El potencial de la polietilenimina ha sido evaluado tanto en varias líneas celulares, incluidas células de origen humano, como *in vivo*. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto su elevada capacidad de transfección; no obstante, en la mayoría de los casos, también se han observado efectos tóxicos importantes asociados a su capacidad permeabilizante de la membrana celular (141). Para solventar éste problema recientemente se han sintetizado polietileniminas de bajo peso molecular a las que se atribuyen menor capacidad de disrupción de membranas y, por tanto, una menor toxicidad (142). Además del peso molecular, la eficiencia/toxicidad del sistema también depende de la estructura polimérica (lineal o ramificada) y de la relación de cargas entre el polímero catiónico y el ADN (143).

La polietilenimina también ha sido modificada químicamente con el fin de incrementar su capacidad de transfección. Así por ejemplo, los polímeros pegilados y los conjugados con ligandos como galactosa, transferrina o folato, han dado lugar a eficacias de transfección superiores a las obtenidas con la polietilenimina original (144). Asimismo en la actualidad se están estudiando diversos sistemas basados en conjugados de β ciclodextrinas con polietileniminas, lineales o ramificadas, para la vehiculización del ADN (145).

4. DENDRÍMEROS

Las estructuras dendríticas se consideran actualmente como la cuarta generación o clase de la arquitectura macromolecular que ha ido desarrollándose desde la aparición de los primeros polímeros, en la década de los años 30 (nylon, plesiglass), hasta la actualidad (Figura 26).

Hoy día ésta última generación de estructuras se suele dividir en libremente hiperramificadas, estructuras dendríticas insertadas, dendrones y dendrímeros siendo éstas dos últimas las que han llamado más poderosamente la atención de investigadores de muy diversas ramas de la ciencia ya que presentan un tamaño nanométrico, una estructura globular o semiglobular, una baja polidispersión, particularmente en comparación con los polímeros tradicionales, y una alta densidad funcional en la superficie con un pequeño volumen molecular (146).

La estructura de los dendrímeros se caracteriza por la existencia de un núcleo, que determina el tamaño, forma, dirección y multiplicidad,

una zona intermedia de capas concéntricas o capas de amplificación y una superficie con un número previsto de grupos funcionales.

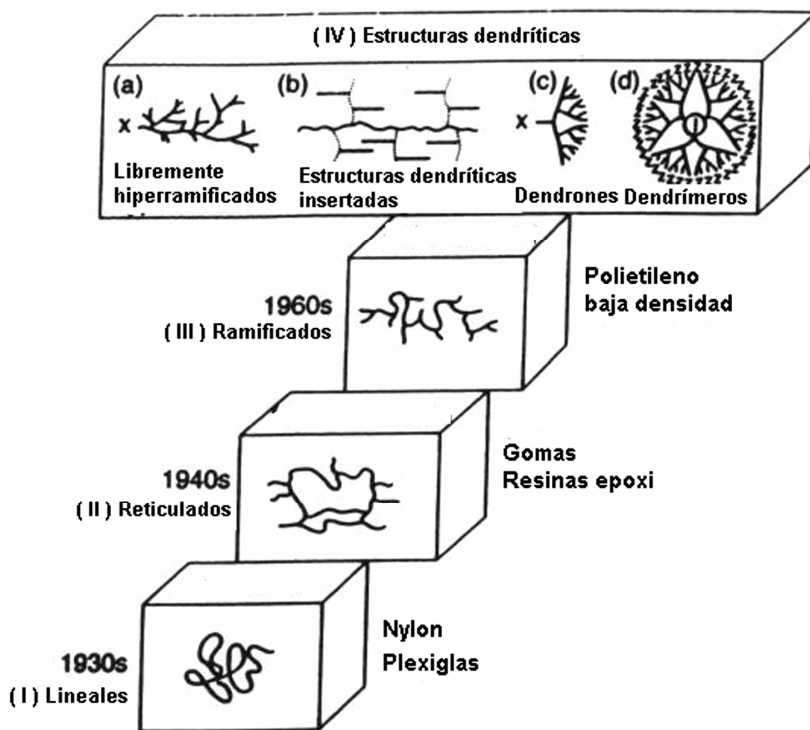


Figura 26: La estructura de los polímeros tradicionales (clases I a III) ha conducido a las estructuras dendríticas o clase IV en las que se agrupan cuatro subclases de polímeros

Cada una de las capas existentes entre el núcleo y la superficie de la estructura determina lo que se conoce con el nombre de generación de la estructura dendrítica. Así, por ejemplo, para un dendrímero de polipropilenimina (PPI) el núcleo es 1-4 diaminobutano y, a medida que se van produciendo reacciones de polimerización, se van creando los llamados núcleos focales o cascadas que determinan la generación de la estructura. Para el dendrímero poliamido-amina (PAMAM) el núcleo es etilendiamina y cada punto focal o cascada origina una nueva generación de dendrímeros que aumenta en aproximadamente 1 nm el

diámetro de su estructura además de duplicar su masa molecular y el número de grupos funcionales (Figura 27).

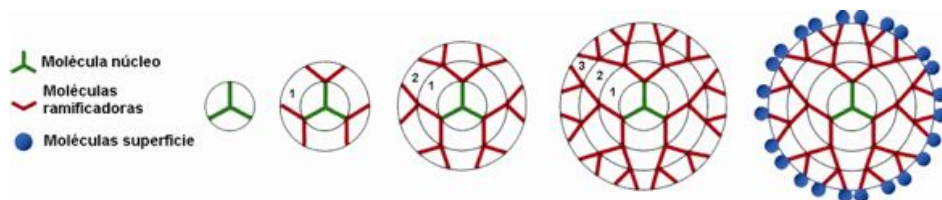


Figura 27: Esquema de la estructura de los dendrímeros. Cada número indica la generación de la estructura polimérica.

A medida que aumenta la generación del dendrímero se modifica su estructura y la distancia entre los grupos superficiales; en el caso de los dendrímeros PAMAM los de las primeras generaciones (G1 a G3) presentan una forma lenticular y una distancia de 10,7 Å entre los grupos superficiales; los dendrímeros de generación G4 a G6 tienen una laxa estructura globular, una distancia de 8,6 a 10,2 Å entre los grupos superficiales y permiten la inclusión de moléculas por lo que son los de elección para la encapsulación y liberación controlada de fármacos. Finalmente los dendrímeros G7 a G10 tienen estructura globular compacta, con una distancia de 7,12 a 5,62 Å entre los grupos funcionales y son los de elección en terapia génica.

Actualmente están comercializados diversos dendrímeros PAMAM, conocidos con el nombre de Starburst y de PPI con el nombre de Astramol, pero el diseño de dendrímeros puede basarse en una gran variedad de uniones como por ejemplo poliaminas, poliamidas y aminas o con subunidades más hidrofóbicas de poliaril éter. Otras modificaciones prometedoras son los llamados glicodendrímeros; modificaciones que pueden producirse en la superficie con PEG o con L-arginina, la conjugación con secuencias endosomolíticas (péptido GALA) o con ligandos como el factor de crecimiento epitelial o con β -ciclodextrina. Finalmente también se están estudiando nuevos dendrímeros bifuncionales obtenidos con la combinación de péptidos catiónicos y lípidos (147)

El interés que los dendrímeros han despertado en la Tecnología Farmacéutica y en numerosos campos de la ciencia no ha ido acompañado, en muchos casos, de los correspondientes estudios de biocompatibilidad y toxicidad. En general las macromoléculas y estructuras policationicas producen una desestabilización de las membranas celulares y causan su lisis. Los dendrímeros PPI y PAMAM, con grupos terminales amino, han mostrado citotoxicidad en cultivos celulares Caco 2 y éste efecto se va incrementando a medida que aumenta la generación del polímero (148). Estos polímeros también muestran efecto hemolítico, cuando se ponen en contacto con una suspensión de hematies, y muestran un efecto mitotóxico superior al de los liposomas catiónicos.

Los dendrímeros PAMAM aniónicos, con grupos carboxilo en la superficie, tienen menor citotoxicidad y efecto hemolítico e incluso los de baja generación no presentan éstos efectos (149). No obstante se debe considerar que la biocompatibilidad de éstos dendrímeros no depende exclusivamente de la naturaleza de la carga superficial ya que, por ejemplo, dendrímeros basados en un esqueleto aromático polieter con grupos carboxilo en la superficie poseen un notable efecto hemolítico.

Para mejorar la biocompatibilidad de los dendrímeros PANAM se ha procedido a una derivatización parcial de los grupos amino con uniones PEG o ácidos grasos obteniéndose una importante reducción en la citotoxicidad y efecto hemolítico si bien la introducción de un elevado número de cadenas lipídicas o de PEG aumenta la citotoxicidad (150). Igualmente la complejación de éstos dendrímeros con ADN u oligonucleótidos reduce significativamente la toxicidad tanto in vitro como in vivo aunque ésta toxicidad también depende de la relación dendrímero:ADN utilizada (151).

Por lo que respecta a la toxicidad in vivo, aun siendo pocos los estudios realizados en ratones, parece deducirse que los dendrímeros PANAM hasta la generación 5 inyectados por vía intraarterial a razón de 10 mg/Kg no producen efecto tóxico (152)

4.1 Dendrímeros como fármacos antivirales: En general los dendrímeros utilizados con ésta finalidad poseen restos aniónicos en su superficie, como restos sulfonato o de ácido siálico, y son capaces de

competir en el proceso de fijación de los virus a la superficie celular tal como, de forma esquemática, se recoge en la Figura 28.

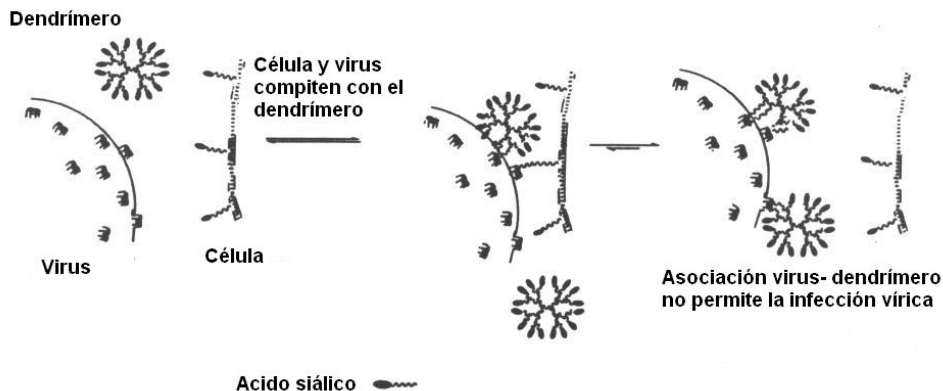


Figura 28: Mecanismo de acción de los dendrímeros como antivirales

Dendrímeros de polilisina modificada con restos naftil o con grupos sulfonato en la superficie se han revelado útiles como inhibidores in vitro del virus herpes simplex (152) al inhibir la entrada del virus en la célula y su posterior replicación. Dendrímeros PAMAM con grupos naftilsulfonato en su superficie han mostrado actividad frente al virus VIH compitiendo, en una primera etapa, con la fijación del virus a la superficie celular y posteriormente impidiendo su replicación a través de la transcriptasa reversa y/o integrasa (153).

La firma australiana Starpharma (154) ha desarrollado un gel (VivaGel) cuyo componente activo es un dendrímero de polilisina (SPL7013) que se fija a proteínas (gpI 20) del virus lo que impide su fijación a los receptores CD4. A mediados del año 2004 éste producto, de aplicación vaginal o anal, ha sido aprobado por el FDA para iniciar el ensayo clínico Fase I constituyendo el primer dendrímero aplicado a humanos y se espera que esté comercializado hacia 2008. El mismo dendrímero ha demostrado actividad frente al virus herpes simplex, de la hepatitis B, Chlamydia y otros. La misma firma está desarrollando dendrímeros activos por vía inhalatoria frente al virus sincitial respiratorio y patógenos emergentes como el coronavirus que produce el síndrome respiratorio severo agudo (SARS).

4.2 Dendrímeros como antibacterianos: En contraste con los dendrímeros antivíricos, los dendrímeros antibacterianos presentan estructuras catiónicas en su superficie como aminas o grupos tetraalquilamonio. En general el mecanismo de acción de éstos dendrímeros es adherirse y dañar la membrana bacteriana aniónica y provocar la lisis bacteriana. Dendrímeros PPI, en los que su superficie ha sido funcionalizada con grupos tetraalquilamonio (Figura 29), han demostrado una potente actividad antibacteriana frente a gérmenes Gram + y - (153) y dendrímeros conteniendo plata han de mostrado in vitro una mayor actividad que las soluciones de nitrato de plata frente a diversas bacterias (155) lo que abre la posibilidad de que éstos compuestos puedan formar parte de apósitos antimicrobianos para el tratamiento de quemaduras.

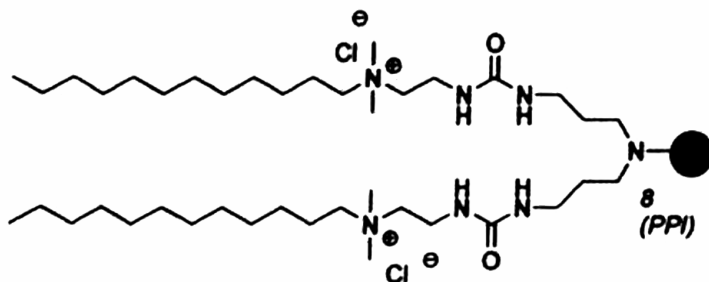


Figura 29: Estructura de un dendrímero PPI con actividad antibacteriana

4.3 Dendrímeros en cáncer: Existen algunos trabajos en los que se describe la encapsulación molecular de citostáticos como adriamicina, metotrexato, 5-fluoruracilo, paclitaxel (156) o bien se han sintetizado dendrímeros que poseen actividad citotóxica como el SPL 7435 de la firma Starpharma que, en estudios comparativos in vitro, ha mostrado una actividad análoga al ABT75 (de la firma Abbott) que se encuentra en fase clínica II en pacientes con cáncer de colon refractario a taxanos.

Las mayores perspectivas de los dendrímeros en oncología se centran en la terapia fotodinámica y en la terapia de captura de neutrones de átomos de boro. En la primera de ellas, utilizando PAMAM de diversas generaciones, se fija ácido 5 aminolevulínico (157) o protoporfirina (158) que absorben energía radiante en la región del rojo pasando de su estado fundamental a un nivel de energía superior que puede transformarse en un estado triplete fotoactivo en el que puede reaccionar con un sustrato originando radicales libres que, a su vez,

pueden reaccionar con oxígeno molecular dando productos citotóxicos. La siguiente fase en el desarrollo de ésta terapia seria la inclusión de sistemas generadores de luz como el par luciferina-luciferasa realizandose su activación una vez que el nanosistema es captado por las células diana.

La terapia de captura de neutrones de boro (BNCT) se basa en que si se puede hacer llegar suficiente cantidad de átomos de boro-10 a la masa tumoral ($> 10 \times 10^9$) y se irradia con neutrones se producen partículas α que alteran el potencial mitótico de las células tumorales. Sobre ésta base se han preparado dendrímeros PAMAM generación 2 y 4 conteniendo isocianatoborano sódico y un anticuerpo monoclonal que orienta el sistema preferentemente a hígado y bazo (159). Igualmente PAMAM conteniendo un complejo de boro y Factor de Crecimiento Epidérmico ha revelado in vitro una especificidad para células tumorales cerebrales (160).

4.4 Dendrímeros y Agentes de Contraste: El ácido gadopentético, compuesto iónico que se utiliza para intensificar el contraste en la exploración por RM, se ha fijado a dendrímeros PAMAM generaciones 2 y 6 y dendrones de polilisina obteniendose los llamados 24-Gd-dtpa y Gadomer 17 encontrandose varios de ellos en fase de investigación clínica por parte de Schering AG. Wiener y col (161), en un intento de incrementar la detección de tumores, han fijado complejos de gadolinio a dendrímeros PAMAM- folato encontrando un 33% de incremento en la detección de tumores ováricos (162).

Otra alternativa se basa en el empleo de glicodendrímeros sobre los que se fijan ligandos funcionales de dtpa (2- (isotiocianatobencil) -6 metildietilentriamina ácido pentaacético) en los que los iones gadolinio estan coordinados en el núcleo de los dendrímeros (163).

4.5 Dendrímeros y Vacunas: Es bien conocido que los péptidos de bajo molecular no son muy inmunogénicos por lo que la respuesta inmune que producen, incluyendo la formación de anticuerpos, es débil. Sin embargo éste problema se puede solventar incrementando el peso molecular de la substancia en cuestión bien por polimerización o bien por acoplamiento a una molécula multifuncional de elevado peso molecular, tradicionalmente una proteína. Para la preparación de inmunógenos bien definidos y reproducibles los dendrímeros se han revelado como

vehículos bien caracterizados y multifuncionales de antígenos que son fijados a los grupos funcionales de su superficie.

Péptido-dendrimeros han sido utilizados para inmunización y vacunación siendo uno de ellos el denominado péptido multiantigénico (MAP) obtenido con mezclas bien definidas de epitopos de células B y T. El MAP es una estructura dendrímica asimétrica que se va formando por generaciones sucesivas de lisina que se acetilan por los grupos amino α y ϵ de residuos precedentes de lisina por lo que éstas estructuras tienen igual número de grupos amino α y ϵ a través de los cuales se puede fijar antígenos de pequeño peso molecular, siendo las estructuras tetra y octámeros las preferenciales en el campo de la vacunas.

En la Figura 30 se recogen diferentes estructuras MAP pudiendo observarse la posibilidad de incluir ácidos grasos o la estructura triplasmítatocisteinil. Estas estructuras han sido objeto de un gran número de estudios con la finalidad de producir anticuerpos específicos y también en el desarrollo de vacunas como por ejemplo frente a la malaria la cual se encuentra actualmente en fase de investigación clínica en humanos (164).

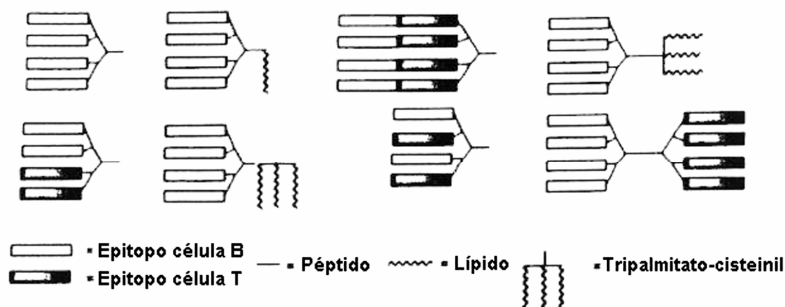


Figura 30: Disposición de algunos sistemas MAP conteniendo epitopos de células B y T con diferentes formas de organizarse en éstas estructuras. También puede observarse la posibilidad de incluir en éstas estructuras ácidos grasos, péptidos y triplasmítato-cisteinil.

Estas estructuras MAP también han servido de base para la preparación de glicodendrimeros o dendrimeros que contienen diversos

monosacáridos en su superficie algunos de los cuales se han visto que son inmunógenos y útiles para la inmunización activa frente al cáncer de colon en modelo de ratones de la línea BALB/c.

Finalmente se pueden señalar los estudios de Rajanathanan (165) en los que los dendrímeros, concretamente un PAMAM generación 5 es adicionado como vehículo potenciador de antígenos (ovoalbúmina) encontrando títulos 10 veces mas altos que cuando solo se administra el antígeno.

4.6 Dendrímeros en terapia génica: La formación de un complejo entre ADN y un polícatión parece ser el factor crucial en la utilización de vectores no virales en la liberación de material genético. En éste sentido los dendrímeros PAMAM forman complejos con el ADN a través de una interacción electrostática producida entre los grupos amino primarios de la superficie del dendrímero y los restos fosfato del ADN. Estudios realizados por light scattering han revelado que el complejo formado está constituido por partículas con un diámetro aerodinámico de 30 a 100 nm dependiendo de la concentración de ADN, del tipo de dendrímero y de la relación ADN/dendrímero.

Los estudios llevados a cabo sobre el mecanismo de transporte de los complejos ADN-dendrímero a través de la membrana celular han revelado que se necesita que el complejo posea una carga catiónica superficial lo cual permite una interacción con las glicoproteínas y lípidos aniónicos componentes de las membranas; ello constituye el inicio de un transporte pasivo, por perturbación en la membrana, o una endocitosis activa la cual parece constituir el mecanismo más relevante ya que, en líneas celulares preincubadas con inhibidores de la endocitosis, se produce una menor transfección.

El tráfico del complejo en el citosol es una cuestión no totalmente dilucidada aunque se conocen algunos aspectos relevantes; en primer lugar, existe cada vez mayor evidencia que los grupos amino de los dendrímeros pueden actuar como sistema tampón de los endosomas impidiendo la acidificación y el acceso de las nucleasas. Por otra parte se sabe que complejos de dendrímeros-oligonucleótidos y de ADN-polietilenimina hiperramificada permanecen intactos en el endosoma y penetran como tales en el núcleo suponiéndose que este comportamiento también es aplicable a los complejos ADN-PAMAM. Este hecho

contrasta con el que presentan los sistema de liberación lipídicos de carácter catiónico en los que se ha observado que el ADN se separa del vector en el endosoma.

La figura 31 muestra un esquema del mecanismo de acción del complejo dendrímero-plásmido ADN el cual se inicia con una interacción entre el complejo y la membrana celular seguida de una endocitosis dependiente de energía. El ADN o el complejo debe salir de la cavidad endosómica-lisosómica, sin que se produzca la degradación ácida o enzimática, y alcanzar el núcleo en donde se produce la transcripción sobre el mRNA y éste en el citosol codifica la proteína terapéutica.

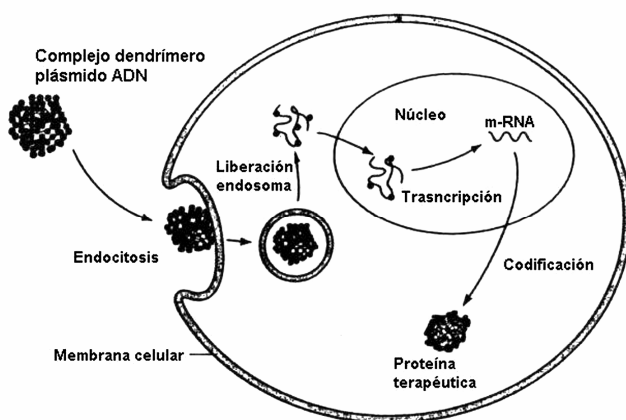


Figura 31: Representación esquemática de la internalización celular de plásmidos asociados a dendrímeros y transcripción de la proteína terapéutica.

La capacidad de los dendrímeros para liberar eficientemente material genético a diferentes líneas celulares puede ser aumentada con la inclusión de ciertos componentes como tensioactivos u oligómeros aniónicos o neutros.

Maksimenko y col. (166) han encontrado que oligómeros como el sulfato de dextrano incrementan la expresión de β galactosidasa a partir de complejos de plásmido ADN-dendrímeros PAMAM. El

aumento de la transfección es atribuido a la formación de agregados grandes y de baja densidad.

El mismo autor encuentra que los oligonucleótidos de mas de 36 bases tienen un efecto beneficioso en la transfección de complejos dendrímero-ADN . Estudios realizados por microscopia electrónica muestran que se forman complejos menos condensados que favorecerían su captación por las células.

Otro grupo de promotores de la transfección está constituido por los denominados desestabilizadores de membrana como el péptido GALA (167). Cuando se emplea el conjugado GALA-PAMAM generación 5 se encuentra un notable incremento en la expresión de β galactosidasa en una gran variedad de líneas células. En éste mismo grupo de promotores se encuentra el Exosurf Neonatal, utilizado en el síndrome de distress respiratorio neonatal, con el que es posible incrementar 10 veces la expresión de luciferasa en una amplia variedad de líneas celulares habiendose establecido que éste efecto se debe al tiloxapol, tensoactivo no iónico que entra en la formulación del Exosurf (168) ya que los dos otros dos componentes, dipalmitoilfosfatidilcolina y alcohol cetílico, no incrementan la transfección. Un aspecto interesante es que la preincubación de células con tiloxapol y su posterior lavado no afecta al incremento de la transfección lo que sugiere que el tensoactivo podría activar temporalmente ciertas propiedades de la membrana celular lo que facilitaría la internalización del ADN.

Finalmente otro grupo de promotores está formado por las ciclodextrinas dentro de las cuales la α ciclodextrina es la que ha mostrado mayor incremento en la transfección de luciferasa en diversas líneas celulares, habiendose establecido que el incremento en la eficiencia de la transfección podría estar ligada a una mejora en la captación del complejo por parte de las células y a una interacción a nivel de la membrana endosomal (169).

Los estudios de transfección in vitro, empleando dendrímeros sobre numerosas líneas celulares (del orden de 35) , han puesto de manifiesto que el incremento depende de la línea celular ya que, por ejemplo con los fibroblastos de mono (CV 1) son transfectados entre un 30 y 80% (según el tipo de dendrímero PAMAM) mientras que solo lo

hace el 1% en la línea celular Jurkat (células T4 de leucemia aguda humana).

En cuanto al tipo de dendrímero y para los de la serie PAMAM el mayor incremento de la transfección, utilizando la línea celular CV 1, se obtiene para la generación 6 siendo la relación dendrímero-ADN más favorable la de 6:1. Durante los estudios de transfección con dendrímeros se observó que algunos de ellos habían sufrido una parcial degradación por solvólisis de las uniones amida y que éstos dendrímeros presentaban una mejor transfección, particularmente si eran de generaciones elevadas (G8). Los estudios estructurales pusieron de manifiesto que los dendrímeros degradados corresponden a polímeros hiperramificados o fracturados habiendo sido comercializados con el nombre de SuperFect.

Bielinska y col (170) han demostrado la capacidad de los dendrímeros PAMAM de complejarse con oligonucleótidos antisentido o vectores de expresión plasmídica que codifican m-RNA antisentido e inhibir la expresión genética de luciferasa.. Habitualmente el problema asociado a la tecnología antisentido comprende la liberación y mantenimiento de altas concentraciones intracelulares durante un periodo largo de tiempo pero, dada la alta susceptibilidad frente a las nucleasas, se han modificado las uniones fosfodiéster y creado fosforotiolato oligonucleótidos que, siendo más resistentes a las nucleasas, muestran una semivida intracelular mas elevada.

Una aproximación a la terapia génica in vivo es la transfección ex vivo para lo que se toma una porción del tejido animal, seguida de una clonación, transfección en cultivo y posterior trasplante al animal. Hasta el momento actual la transfección ex vivo utilizando dendrímeros ha sido demostrada en córneas de conejo y humanos y en el modelo de trasplante cardiaco murino (171; 172).

En el caso del trasplante de córnea el principal problema es el rechazo del injerto (173) (aproximadamente un 26% al cabo de 5 años). Utilizando el dendrímero SuperFect, asociado a un plásmido que codifica una proteína, se consigue disminuir los niveles de TNF y mejorar la supervivencia del injerto.

En el caso del trasplante cardíaco la inyección directa o intracoronaria del complejo PAMAM G5 y plásmido que codifica β galactosidasa se ha encontrado una máxima expresión al cabo de 7 a 14 días que se mantiene durante 4 a 6 semanas. La expresión de β galactosidasa se ha encontrado en el epicardio, endotelio vascular y fundamentalmente en el miocardio (174).

Finalmente los dendrímeros PAMAM también han sido utilizados para estudios de terapia génica in vivo, recurriendo a su administración por vía i.v., intraperitoneal y nasal (175).

Conclusión: La búsqueda de la “bala mágica” en terapia génica continua y aunque los dendrímeros catiónicos PAMAM y los PPI no satisfacen totalmente los requerimientos exigidos a un perfecto sistema de transfección sin embargo representan un gran avance y actualmente son objeto de numerosos trabajos de investigación. Tomalia y col. (176) consideran que las propiedades de los polímeros dendríticos asociados a metodologías de liberación genética como la electroporación o el bombardeo de partículas o “pistola génica” permitirán solventar problemas asociados a la vectorización química y liberación que se presentan con las tradicionales estrategias.

La búsqueda de nuevos principios activos y la terapia génica constiuyen las principales líneas de investigación en el campo de los dendrímeros aunque también resultan interesantes, y poco exploradas, su utilización como modificadores de las membranas biológicas y así estudios realizados en asa intestinal de rata han puesto de manifiesto que dendrímeros aniónicos PAMAM son absorbidos rápidamente por lo que se ha sugerido la posibilidad de que éste tipo de dendrímeros podrían utilizarse en sistemas de liberación por vía oral (177)

EPILOGO

En las páginas precedentes he presentado los aspectos más novedosos de aquellos nanosistemas que en los últimos años son objeto de mayor atención en el campo de la Nanotecnología Farmacéutica y que representan avances importantes en la Nanomedicina. Dado el vertiginoso desarrollo que ha experimentado ésta área en los últimos años

no he pretendido realizar una revisión exhaustiva sino solo presentar algunos de los aspectos mas relevantes que muestran que la Tecnología Farmacéutica se encuentra en un momento inmejorable para aplicar sus esfuerzos en el desarrollo de nuevas formulaciones con las que conseguir una liberación controlada en el espacio (vectorización) que permita obviar o minimizar problemas terapéuticos de fármacos que siguen siendo considerados como elementos importantes en la farmacoterapia o bien mejorar simplemente su biodisponibilidad como es el caso de la tecnología de Nanocristales (que permite que el fármaco se libere en forma de partículas de unos 200 nm) patentada por la compañía Elan Pharma y que ya es utilizada por un importante número de compañías farmacéuticas.

La Nanotecnología Farmacéutica se encuadra actualmente en lo que, en la taxonomía de la nanomedicina, se conoce con el nombre de Biopharmaceutics la cual se ocupa de la liberación de fármacos a través de la nanoencapsulación y de una nueva área que podríamos denominar portadores funcionales de fármacos como son los dendrímeros o los más recientes como son los fulerenos con los que Wilson, de la compañía C-Sixty, ha ideado diversos sistemas que consisten en fijar fármacos, isótopos y liposomas a nanutubos para uso de ellos en áreas como sida, trastornos neurodegenerativos y cáncer. El hecho de que la Nanotecnología Farmacéutica se considere actualmente incluida en un área muy específica de la nanomedicina no implica que sea la única en la que pueda desarrollar su actividad investigadora ya que existen otras como la de diagnóstico por imagen, la de implantes de válvulas cardíacas, recubiertas con alcohol polivinílico que controla la liberación de antiagregantes, etc en las cuales el tecnólogo farmacéutico, por su formación biofarmacéutica, farmacocinética y terapéutica puede intervenir en proyectos de investigación encuadrados en éstas áreas.

Los avances de la nanotecnología son aprovechados por numerosas áreas científicas y particularmente por las ciencias de la salud y entre ellas las Ciencias Farmacéuticas. Pero debido a éste carácter multidisciplinar de la nanotecnología no puede resultar sorprendente que cada vez confluyan las más diversas áreas del conocimiento en las ciencias biomédicas o en lo que Hod denomina, en un trabajo publicado en Science (178) ,” biología de sistemas”. Un buen ejemplo de ésta nueva situación lo constituye el artículo de Sun y col., publicado en

Physical Review Letters, titulado: “Estructura electrónica y de unión de oro a un agregado de SiO_2 : una nanobala para tumores”.

Este nuevo panorama va acompañado de un enorme esfuerzo inversor ya que el National Science Foundation prevee que para el año 2015 se haya invertido un billon de dólares en el campo de la nanotecnología y un importante porcentaje vaya destinado a los sectores de sanidad y particularmente a la terapia anticancerosa. Todos éstos esfuerzos de la investigación, acompañada de una excepcional dotación económica, constituyen una buena razón para sentirse moderadamente optimistas en que el cáncer se podrá curar hacia 2015, tal como adelanta Blagosklonny (179) en un reciente artículo en el que se menciona como liposomas, nanopartículas, nanotubos y otros nanosistemas tendrán un papel fundamental en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Cada vez se conocen con mayor precisión mecanismos acerca de los cuales no se sabe todo y con frecuencia éste crecimiento constante de nuestros conocimientos puede compararse con esas muñecas rusas que se encajan unas en otras pero con la diferencia de que, en ocasiones cada vez que se abre una muñeca, la que está dentro es mas grande aun que la anterior. A pesar del moderado optimismo que se deriva de los constantes y espectaculares avances de la nanomedicina, ¿se logrará añadir, mediante una fórmula lograda, no solo años a la vida sino también vida a los años ?.

Además de lo que se pueda obtener de las nuevas tecnologías, el futuro de los medicamentos se basará en un conocimiento cada vez mas sutil de los procesos naturales, de una detección más precisa y precoz de sus alteraciones y sus causas pero también teniendo en cuenta, como ya advertia Platón en uno de sus Diálogos, que el bello discurso y el medicamento deben ser usados conjuntamente porque, de otro modo, se comete el error de pensar que el cuerpo y el alma pueden ser tratados por separado.

Sea como fuere, la búsqueda de nuevos medicamentos continúa. Sin triunfalismo, sin optimismo exagerado, ya que de ellos la humanidad sigue confiando en victorias sobre trastornos todavía demasiado numerosos, muy dolorosos y en muchos casos mortales.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) -. [http:// nihroadmap.nih.gov](http://nihroadmap.nih.gov)
<http://www.capconcorp.com/roadmap04>
- (2) -. UK Royal Society and Royal Academy of Engineering (2004) : Report on Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. www.nanotec.org.uk
- (3) -. Commision of the European Communities Communication (2004).Towards a European Strategy for Nanotechnologie www.cordis.lu/nanotechnology
- (4) -. Moghimi SH, Hunter AC., Murray JC.: (2005) Nanomedicine: current status and future prospects: FASEB: 19; 311 – 330
- (5) -. Lavan D.A., Lynn D.M., Langer R. (2002) : Moving smaller in drug discovery and delivey: Nature Reviews: 1; 77;
- (6) -. Cancer Nanotechnology: U.S. Department of Health and Human Sciences. National Cancer Institute. Enero 2004
- (7) -. Steinberg F.M., Raso J.: (1998) Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An overview: J.Pharm. Sci:1; 48-53
- (8) -. Dominguez-Gil A., Martin A.: Avances en Tecnología Farmacéutica. Monografía XV. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid 2004.
- (9) -. Gutierrez de Rubalcava C.P.: Desarrollo de Liposomas recubiertos con derivados celulósicos: evaluación in vitro e in vivo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago (1.998)
- (10) -. Crowe J.H., Crowe L.M.: (1998) Factors affecting the stability of dry liposomes: Biochim. Biophys. Acta: 939; 327;
- (11) -. Crowe L.M., Womersley C., Crowe J.H., Reid D., Appel I, Rudolph A.: (1986) Prevention of fusion and leake in freeze-dried liposomes by carbohydrates: Biochem. Biophys. Acta: 861; 131;
- (12) -. Crowe L.M., Crowe J.H., Rudolph A., Womersley C., Appel I.; (1985) Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose: Arch. Biochem. Biophys.: 242; 240;

- (13) -. Payne N.I., Timmins P., Ambrose C.V., Ward M.D., Ridgway F.: (1986) Proliposomes: a novel solution to an old problem: *J. Pharm. Sci.*: 75; 325.
- (14) -. Park J.M., Ahn B., Yoon E.J., Lee M.G., Shim C.K., Kim C.K.: (1994) The pharmacokinetics of methotrexate after intravenous administration of methotrexate loaded proliposomes in rats: *Biopharm. Drug Disposit.*: 15; 391
- (15) -. Kikuchi H. Yamauchi H., Hirota S.: (1991) A spray-dried method for mass production of liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* 39; 1522
- (16) -. Wang J.I., Xu Y.R., Huang K., Sun L.Y.: (1995) Proliposomes targeting to rabbit brain tissue: *J. Pharm. Pharmacol.*: 47; 1053 - 1057
- (17) -. Lee H.J., Ahn B.N., Yoon E.J., Paik W.H. Shim C.K., Lee M.G.: (1995) Pharmacokinetics and tissue distribution of adriamycin and adrimycinol after intravenous administration of adriamycin loaded liposomes to rats: *Inter. J. Pharm.*: 121; 1 - 9
- (18) -. Moghini S.M. , Patel H.M.: *Liposome Technology*. G. Gregoriadis (1993) : 2^o Ed. Vol 3: CRC Press. Boca Raton
- (19) -. Sunamoto J., Sato T., Taguchi T., Hamzaki H.: (1992) Naturally occurring polysaccharide derivatives wich behave as an artificial cell wall on an artificial cell liposome: *Macromol.*: 25; 5665 - 5670
- (20) -. Moreira J.N., Almeida L.M., Geraldés C.F., , Costa M.L.: (1996) Evaluation of in vitro stability of large unilamellar liposomes coated with modified polysaccharide (O-palmitoylpullulan) : *J. Materials Sci. Materials Medicine*: 7; 301 - 306
- (21) -. Moreira J.N., Almeida L.M., Geraldés C.F., Madeira V.M.C., Costa M.L.: (1997) Carboplatin liposomes coated with O-palmitoylpullulan: in vitro characterization: *Inter. J. Pharm.*: 147; 153 - 159
- (22) -. Torchilin V.P.: (1996) How do polymers prolong circulation time of liposomes ? : *J. Liposome Res.*: 6; 99 - 110
- (23) -. Parr M.J., Ansell S.M., Choi L.S., Cullis P.R.: (1994) Factors influencing the retention and chemiocal stability of polyethyleneglycol lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles: *Biochim. Biophys Acta*: 1195; 21 - 30

- (24) -. Blume G., Cevc G.: (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo: *Biochim. Biophys. Acta*: 1146; 157 - 164
- (25) -. Woodle M.C., Matthey K.K., Newman M.S. y col: (1992) Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes: *Biochim. Biophys. Acta*: 1105; 193 - 203
- (26) -. Woodle M.C., Lasic D.D.: (1992) Sterically stabilized liposomes: *Biochem. Biophys. Acta*: 1113; 171 - 179
- (27) -. Nikolova A.N., Jones M.N.: (1996) Effect of grafted PEG 2000 on the size and permeability of vesicles: *Biochim. Biophys. Acta*: 1304; 120 - 128
- (28) -. Litzinger D.C., Buiting A.M.J., van Rooijen N., Huang L.: (1994) Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipatic polyethyleneglycol containing liposomes: *Biochim. Biophys. Acta*: 1190; 99 - 110
- (29) -. Yuda T., Muruyama K., Iwatsuru M.: (1996) Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols: *Biol. Pharm. Bull.*: 19; 1347 - 1353
- (30) -. Kirpotin D., Hong K., Mullah N., Papahadjopoulos D., Zalipsky S.: (1996) Liposomes with detachable polymer coating: destabilization and fusion of dioleoylphosphatidylcholine vesicles triggered by cleave surface grafted polyethyleneglycol: *FEBS Lett.* 388; 115 - 121
- (31) -. Torchilin V.P., Weissig V.: (2005) *Liposomes*. Oxford University Press.
- (32) -. Lasic D., Martín F.: (1995) *Stealth Liposomes*: CRC Press. Boca Raton
- (33) -. Guo X., Szoka Jr F.C.: (2001) *Bioconf Chem.*: 12; 29 - 33
- (34) -. Romero E.L., Morilla M.J., Regts J., Koning G.A., Scherphof G.L.: (1999) : On the mechanism of hepatic transepithelial passage of large liposomes: *FEBS Lett.*: 448; 193 - 197
- (35) -. Huang L., Hung M-C, Wagner E.: (1999) *Nonviral Vectors for Gene Therapie*. Academic Press. San Diego
- (36) -. Hofland H.E.J., Shephard L., Sullivan S.M.: (1996) Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*: 93; 7305 - 7312

- (37) -. Merdan T., Kopecek J. Kissel T.: (2002) Prospects for cationic polymers in gen and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 54; 715 - 722
- (38) - Fomiyana J.: (2005) Vectores de Transferencia en Terapia Génica: En 5º Curso de Biotecnología Aplicada. Sanidad Ediciones. Madrid
- (39) -. Godbey W.T., Mikos A.G.: (2001) Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes: *J. Control Release*: 72; 115 - 126
- (40) -. Lappalainen K., Jaaskelainen I., Syjanen K., Urtti A., Syrjanen S.: (1994) Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes: *Pharm. Res.*: 11; 1127 - 1134
- (41) -. Dokka S., Toledo D., Shi X., Castronova V., Rojanasakul Y.: (2000) Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes: *Pharm. Res.*: 17; 521 - 530
- (42) -. Filion M.C. Philips N.C.: (1997) Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells: *Biochim. Biophys. Acta.*: 1329; 345 - 352
- (43) -. Freemark B.D., Blezinger H.P., Florack V.J.: (1998) Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid-cationic complexes: *J. Immunol.* 160; 4580 4591
- (44) -. Lakkaraju A., Dubinsky J.M., Low WC, Rahman Y-E.: (2001) Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes: *J. Biol. Chem.*: 276; 32.000 - 32009
- (45) -. Patil S.D., Rhodes DG: (2000) Conformation of oligodeoxynucleotides associated with anionic liposomes: *Nucleic Acids Res.*: 14; 4052- 4055
- (46) -. Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J.: (2004) : Anionic liposomal delivery system for DNA transfection: *AAPS Journal*; 6; E29 - 51
- (47) -. Venugopalan P., Jain S., Sankar S., Singh P., Rawat A., Vyas S.P.: (2002) :pH- Sensitive liposomes: mechanism of triggered release to drug and gene delivery prospects: *Pharmazie*: 57; 659 - 668
- (48) -. Legendre J.Y., Szoka Jr. FC, (1992) Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes: *Pharm. Res.*: 9; 1235 - 1242

(49) -.Li S., Rizzo M.A. Bhattacharya S, Huang L. : (1998) : Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery: *Gene Ther.* 5; 930 - 937

(50) -. Hafez IM., Ansell S. Y Cullis P.R.: (2000) : Tunnable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids: *Biophys. J.* 79; 1438 - 1446

(51) -. Slepushkin A.S., Simoes S., Dazin P. Newman M.S., Guo L.S., Pedroso Lima M.C.: (1997) : Sterically stabilized pH-sensitive liposomes: Intracellular delivery of aqueous content and prolonged circulation in vivo: *J. Biol. Chem.* 272; 2382 - 2388

(52) -. De Oliveira M.C., Fattal E., Couvreur P, Lesieur P., Bourgaux C., Ollivon M.: (1998) *Biochim. Biophys. Acta*: 1372; 301 - 309

(53) -.Dedaly J.A., Low P.S.: (2000) : Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation: *J. Control Release*: 64; 27 - 37

(54) -. Sviridov Y.V., Zhdanov R.S., Podobed O.V. et al: (2001) : The Lac Z gen transfer into L929 cells and (14C) DNA tissue distributio following intraperitoneal administration of new pH-sensitive lipoplexes in mice: *Cytobios*: 106; 7 - 15

(55) -. Maclean A.L., Symonds G., Ward R: (1997) Immunoliposomes as targeted delivery vehicles for cancer therapeutics: *Int. J.Oncol.* 11: 325 - 333

(56) -. Xu L., Huang C-C, Huang W.: (2002) Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes: *Mol. Cancer Ther.*: 1; 337 - 344

(57) -. Shi N., Zhang Y., Zhu C., Boado RJ, Pardridge WM.: (2001) Brain-specific expression of an exogenous gene after IV administration: *Prod. Natl. Acad. Sci USA*: 98; 12754 - 12760

(58) -. Krauss WC, Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Brenz CC: (2000) Emerging antibody-based HER2 (Erb-2/neu) therapeutics: *Breast Disease*: 11; 113 - 119

(59) -. Schnyder A., Krähenbül S., Drewe J., Huwyler J. (2005) : Targeting of daunomycin using biotinylated immunoliposomes: *Pharmacokinetics. Tissue*

distribution and in vitro pharmacological effects: *J. Drug Targeting*: 13; 325 - 335

(60) -. Reddy J.A., Low P.S.: (1998) *Crit. Rev. Ther. Drug*: 15; 587

(61) -. Diebold S.S., Kursa M., Wagner E., Cotten M., Zenke M.: (1999) : Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells: *J. Biol. Chem.* 274; 19087 - 19094

(62) -. Hashida M., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y.: (2001) : Cell-specific delivery of genes with glycosilated carriers: *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 52; 187 - 196

(63) -. Needham D., Dewhirst M.W.: (2001) : The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors: *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 53; 285 - 305

(64) -. Kono K.: (2001) : Thermosensitive polymer-modified liposomes: *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 53; 307 - 319

(65) -. Brandl M., Tardi C., Drechsler M., Bachmann D., Reszka R., Bauer KH: (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 24; 161

(66) -. Grohgan H., Hansen E., Brandl M.: (2000) *Liposome Res.* 10; 223 - 231

(67) -. Bochet C.G.: (2002) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*: 1; 125

(68) -. Zalipsky S., Qazen M., Walter J.A., Mullah N., Quin Y., Huang S.K.: (1999) : New detachable poly (ethylene glycol) / conjugates: cysteine cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid diacyl phosphatidylethanolamine: *Bioconj. Chem.*: 10; 703 - 712

(69) -. Elferink M.G.L., de Wit J.G., Driessen A.J.M., Knonings W.N.: (1994) : Stability and proton-permeability of liposomes composed of archeal tetraether lipids: *Biochem. Biophys Acta*: 1193; 247

(70) -. Wang G., Hollingsworth R.I.: (1999) : Synthesis and properties of a bipolar bisphosphatidyl ethanolamine that form stable dimensional self-assembled bilayer systems and liposomes: *J. Org. Chem.*: 64; 4140 - 4148

(71) -. Krisnan L, Sprott GD.: (2003) : Archeosomes as Self-adjuvanting delivery systems for cancer vaccines: *J. Drug Targeting*: 11; 515 – 524

(72)-. Gregoriadis G.: (2002) Liposomes in drug and vaccine delivery: Drug Deliver Systems& Sciences: 2; 91 - 97

(73) -. Dubey P.K., Mishra A., Jain S., Mahor A., Vyas S.P.: (2004) Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. Journal of Drug Targeting: 12; 257 - 266

(74) -. Raffaghello L: (2003) : Immunoliposomal fenretinide : a novel antitumoral drug for human neuroblastoma: Cancer Lett: 297; 151 – 155

(75) -. Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R.: (2005) : Novel mechanism of hybrid liposomes-induced apoptosis in human tumor cells: Int. J. Cancer: 115; 377 – 382

(76) -. Molema G., Meijer (Eds) : (2001) Targeting Organ Specific Strategies: Wiley-VCH. Weingem

(77) -. www.bernabiotech.es

(78) -. Bacon A., Caparros-Wanderley W., Zadi B., Gregoriadis G.: (2002) Induction of a cytotoxic T lymphocyte (CTL) response to plasmid DNA delivered via Lipodine liposomes: J. Liposome Res.: 12; 173 – 182

(79) -. Khudairi T., Khaw B.A.: Preservation of ischemic myocardial function and integrity with targeted cytoskeleton-specific immunoliposomes: (2004) : J. Am. Coll. Cardiol.: 43; 1683 – 1689

(80) -. Adams M.L., Lavasanifar A. Y Kwon G.S.: (2003) Amphiphilic block copolymers for Drug Delivery: J. Pharm. Sci.: 92; 1343 – 1354

(81) -. Duncan R.: The dawning era of polymer therapeutics: (2003) Nature Reviews Drug Discovery: 2; 347 – 360

(82) -. Myers D.: Association Colloids: (1999) : Micelles, vesicles and membranes. En Myers D. Editor. Surfaces, interfaces and colloids: Principles and applications 2^a Ed New York: John Wiley& sons. Pg 383

(83) -. Yokoyama M., Sugiyama T. Okano T., Sakurai Y. Naito M. Y Kataoka K.: (1993) : Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol) -poly (aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography: Pharm Res.: 10; 895-899

(84) -. Lee J.H., Lee HB, Andrade J.D.: (1995). Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. Prog Polym Sci: 20; 1043 – 1079

(85) -. Zhang F, Kang ET, Neoh KG, Huang W.: (2000) Surface modification of poly(tetrafluoroethylene) films via grafting of poly(ethylene oxide) for reduction of protein adsorption: *J. Biomater Sci Polym.*: 11; 169-186

(86) -. Kwon GS, Suwa S., Yokoyama M. Okano T., Sakurai Y y Kataoka K. (1994) Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly (ethylene oxide- aspartate) block copolymer doxorubicin conjugates: *J. Control Release*: 29; 17-23

(87) -. Li Y., Kwon GS: (2000) : Methotrexate esters of poly(ethylene oxide) - block- poly(2 hydroxyethyl-L-aspartamide).I. Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. *Pharm Res.* 17; 607-611

(88) -. Yokoyama M., Opanasopit P., Okano T., Kawano K., Maitani Y.: (2004) : Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin: *J. Drug Targeting*: 12; 373 – 384

(89) -. Bae Y., Jang W-D., Nishiyama N., Fukushima S., Kataoka K.: (2005) Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular BioSystems*

(90) -. Harada A., Togawa H., Kataoka K: (2001) Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly (ethylenglycol) - poly (L-lisine) block copolymers: *Eur. J. Pharm. Sci.*: 13; 35-42.

(91) -. Harada A., Katoaka K.: (2001) : Pronounced activity of enzymes through the incorporation into de core polyion complex micelles made from charged block copolymers: *J. Control Release*: 72; 85-91

(92) -. Nishiyama N., Okazaki S., Cabral H., Miyamoto M., Kato Y., Sugiyama Y, Nishio K., Matsumura Y., Kataoka K.: (2003) : Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice: *Cancer Research*: 63; 8977-8983

(93) -. Matsumura Y.: (2002) : Phase I clinical trial of nk911, polymeric micelle encapsulated doxorubicine. Abstracts of the 2nd international symposium on tumor targeted delivery systems: Minneapolis, MN: Controlled Release Society, pg 30

(94) -. Liggins RT, Burt HM: (2002) : Polyethylene-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formations: *Adv Drug Deliv Rev.* 54; 191 – 202.

(95) -. Yoo HS, Park TG: (2001) : Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugate PLGA-PEG block copolymer: *J. Control Release* 70; 63 - 70:

(96) -. Jeong B., Lee KM, Gutowska A, An AY: (2002) : Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering. *Biomacromolecules*: 3; 865 – 868

(97) -. Kissel T., Li Y, Unger F.: (2002) : ABA-triblock copolymers from biodegradable polyesters: A block and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins: *Adv Drug Deliv Rev.*; 54; 99 – 134

(98) -. Krishna R., Mayer LD: (2000) : Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanism, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs: *Eur J. Pharm. Sci.* 11; 265 – 283

(99) -. Batrakova EV, Li S., Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov A.V. (2001) : Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Brit J. Cancer*: 85; 1987 – 1997

(100) -. Rapoport NY., Herron JN., Pitt Wg., Pitina L.: (1999) : Micellar delivery of doxorubicine and its paramagnetic analog , ruboxil, to HL-60 cells: Effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake: *J. Control. Release*: 58; 153 – 162

(101) -. Alakhov VY., Moskaleva EY., Batrakova EV., Kabanov AV: (1996) : Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 copolymer: *Bioconjug. Chem.*: 7; 209 – 216

(102) -. Batrakova EV., Li S., Miller DW., Kabanov AV.: (1999) : Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers: *Pharm. Res.*: 16; 1366 – 1372

(103) -. Marin A., Sun H., Hussein GA, Pitt WG, Christensen DA, Rapoport NY.: (2002) : Drug delivery in Pluronic micelles: Effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake: *J. Control. Release*: 84; 39 – 47

(104) -. Tracy M.: (1998) : Development and scale-up of a microsphere protein delivery system: *Biotechnol. Progr.*: 14; 108 - 115

(105) -. Johansen P., Men Y., Merkle HP., Gander B.: (2000) : Revisting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*: 50; 129 - 146

(106) - Kumaresh S., Soppimath K.S., Aminabhavi TM, Kulkarni AR., Rudzinski WE: (2001) : Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices: *J. Control Release*: 70; 1 - 20

(107) -. Fu K., Pack DW., Kilibanov AM., Langer R.: (2000) : Visual evidence of acidic environmental withing degrading polylactic-co-glycolic (PLGA) microspheres: *Pharm. Res.*: 17; 100 – 106

(108) -. Zhu G., Mallery SR., Schwendeman SP. (2000) : Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide) : *Nature Biotech*: 18; 52 - 57

(109) -. Sanchez A., Tobio R., Gonzalez L., Fabra A., Alonso MJ.: (2003) : Biodegradable micro and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon alpha: *Eur J. Pharm Sci.* : 18; 221 – 229

(110) -. Sanchez A., Villamayor B., Guo Y., McIver J., Alonso JM: (1999) : Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly (Lactide-co-glycolide) microspheres: *Int J. Pharm.*: 185; 255 - 266

(111) -. Tobio M., Schwendeman SP., Guo Y., McIver J., Langer R., Alonso MJ.: (2000) : Improve immunogenicity of a core coated tetanus toxoid delivery vehicle: *Vaccine*: 18; 618 - 622

(112) -. Blanco D., Alonso MJ: (1998) : Protein encapsulation and release from poly (lactide-co glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and the effect of the co-encapsulation of surfactants: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*: 45; 285 - 294

(113) -. Blanco D., Alonso MJ.: (1997) : Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*: 43; 287

(114) -. Tobio M., Gref R., Sanchez A., Langer R., Alonso MJ.: (1998) : Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration: *Pharm. Res.*: 15; 270 – 276

(115) -. Hawley A.E., Illum L., Davis SS.: (1997) : Lymph node localisation of biodegradable nanospheres surface modified with pòloxamer and poloxamine block copolimers: FEBS Lett. 400; 319 – 323

(116) -. Moghimi SM:, Hawley AE., Christy NM: Gray T. Illum L., Davis SS.: (1994) : Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph node: FEBS Lett.: 344; 25 - 30

(117) -. Csaba N., Gonzalez L., Sanchez A., Alonso MJ.: (2004) : Design and characterization of new particulate blends for drug delivery: J. Biomat Sci. Polymer Ed.: 15; 1137 - 1151

(118) -. Csaba N., Caamaño P., Sanchez A., Dominguez F.,Alonso JM: (2005) : PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery: Biomacromolecules: 6; 271 - 278

(119) -. Csaba N: (2005) : Desarrollo de nuevos vehículos para la administración de vacunas genéticas. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

(120)., Park IK., IHM JE., Park YH., Choi YJ., Kim SI., Kim WJ., Akaike T., Cho CS. (2003) Galactosylated chitosan (GC) -graft-polyvinyl pyrrolidone (PVP) as a hepatocyte-targeting DNA carrier. Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex: J. Control Release: 86; 349 - 359

(121) -. Yang F., Cui X., Yang X: (2002) : Interaction of low molecular weight chitosan with mimic membrane studies by electrochemical methods and surface plasmon resonance: Biophys Chem.: 99; 99 - 106

(122) -. Mao HQ., Roy K., Truong-Le VL., Walsh SM., August JT., Leong KW.: (1996) : DNA-chitosan nanospheres for gene delivery: Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater.: 23; 401 – 402.

(123) -. Leong KW., Mao HQ, Truong-Le VL., Roy K., Walsh SM., August JT.: (1998) : DNA-polycation nanospheres as Non-viral gene delivery vehicles: J. Control. Release: 53; 183 – 193.

(124) -. Mao HQ., Truong-Le VL., August JT, Leong KW.: (1997) : DNA-chistosan nanospheres: derivatization and storage stability: Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater.: 24; 671 – 672.

(125) -. Janes KA. Y col: (2001) : Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47; 83 – 97

(126) -. MacLaughlin FC, Mumper RJ., Wang J., Tagliaferi JM., Gill I., Hinchcliffe M., Rolland AP.: (1998) : Chitosan and depolymerised chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery: *J. Control Release*: 56; 259 – 272

(127) -. Kiang T. y col: (2004) : The effect of degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection: *Biomaterials*: 25; 5293 – 5301.

(128) -. Koping-Hoggard y col.: (2001) : Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationship and characteristics compared with polyethyleneimine in vitro and after lung administration in vivo: *Gene Therapy*: 8; 1108 - 1121

(129) -. Iqbal M., Lin W., Jabbal-Gill I., Davis SS., Steward MW., Illum L. (2003) : Nasal delivery of chitosan DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice: *Vaccine* 21; 1478 - 1485

(130) -. Davis SS., Illum L.: (2003) Absorption enhancers for nasal drug delivery :: *Clinical Pharmacokin.*: 42; 1107 - 1128

(131) -. Prego C.: (2005) :Nanocápsulas de quitosano: nuevos vehículos para el transporte de péptidos a través de la mucosa nasal e intestinal: Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.

(132) -. Alonso M., Teijeiro D., Remuñan C., Alonso MJ.: (2004) Chitosan-glucomannan nanoparticles as oral delivery systems for insulin: 2 Pharmaceutical World Congress, Kyoto: 239 –240

(133) -. El-Shabouri MH.: (2002) : Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin A: *Int. J. Pharm.*: 249; 101 - 108

(134) -. Mannisto y col: (2002) : Structure activity relationships of poly (L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on the physicochemical and biological properties: *J. Control Release*: 83; 169-182

(135) -. Jeong JH., Park TG: (2002) : Poly (L lisine) -g-poly (DL-lactic glycolic acid) micelles for low cytotoxic biodegradable gene delivery carriers: *J. Control Release*: 82 (1) 159-166

(136) -. Ward CM. y col.: (2002) : Modification of PLL-DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo. *J. Gene Med.*: 4; 1 – 12

(137) -. Suh W, y col: (2001) : Anti JL-1 antibody conjugated poly (L lisine) for targeted gene delivery to leukaemia T cells: *J. Control Release*: 72; 171 – 178

(138) -. Nishikawa y col.: (1998) : Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes in vivo: optimisation pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly (L Lisine) complexes by controlling their physicochemical properties: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 287; 408 – 415

(139) -. Wagner E. Y col.: (1998) : Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery: *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 30; 97 - 114

(140) -. Chan CK.: (2000) : Supramolecular structure and nuclear targeting: efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines: *Gene Therapy*: 7; 1690 – 1697

(141) -. Garret MC: (1999) : Gene delivery systems using cationic polymers: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*: 16 (2) 147 - 207

(142) -. Kunath y col. (2003) : Low molecular weight polyethyleneimine as non viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo biodistribution with high molecular weight polyethyleneimine: *J. Control Release*: 89; 113 - 125

(143) -. Wightman y col: (2001) : Different behaviour of branched and linear polyethyleneimine for gene delivery in vitro and in vivo: *J. Gene Med.*: 3 (4) ; 362 - 372

(144) -. Wagner E. (2004) : Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: Will artificial viruses be the answer?: *Pharm. Res.*: 21 (1) ; 8 14.

(145) -. Pun SH., Davis ME. (2005) : Cyclodextrin- containing polymers for gene delivery. En: *Polymeric gene delivery: principles and applications*. M.M. Amiji Ed.: CRC Press. Boca Raton

(146) -. Boas U., Heegaard P.: (2004) : Dendrimers in drug research: *Chem. Soc. Rev.*: 33; 43 - 63

(147) -. Bayele HK. Y col: (2005) : Versatile peptide dendrimers for nucleic acid deliery: *J. Pharm. Sci.*: 94; 446 - 457

(148) -. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J, Kissel T.: (2003) : In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis: *Biomaterials*: 24; 1121 – 1131

(149) -. Malik N. Wiwattanapatapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener JW., Meijer EW., Paulus W., Duncan R. (2000) : Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro and preliminary studies on the distribution of I-125 labelled polyamidoamine dendrimers in vivo: *J. Controlled Release*: 65; 133 – 148

(150) -. Jevprasesphant J., Penny J., Attwood D., McKeown NB., D'Emanuele NB.: (2003) : The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers: *Int J. Pharm.*: 252; 263 - 266

(151) -. Shah DS., Sakthivel T., Toth I., Florence AT., Wildespin AF.: (2000) : DNA transfection and transfected cell viability using amphiphilic asymmetric dendrimers: *Int. J. Pharm.*: 208; 41 – 48

(152) -. Bourne N., Stanberry LR., Kern ER., Holan G., Mattheus B., Bernstein DI. : (2000) : Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against Herpes Simplex virus infection: *Antimicrob. Agents Chemother.*: 44; 2471 – 2474.

(153) -. Witvrouw M., Weigold H., Pannecouque C., Schols D., DeClercq E., Holan G. (2000) : Potent anti-HIV (Type 1 and Type 2) activity of polyoxometalates: Structure-Activity relationship and mechanism of action: *J. Med. Chem.*: 43; 778 - 783

(154) -. [http// www.starpharma.com](http://www.starpharma.com)

(155) -. Balogh L., Tomalia DA., Hagnauer GL., McManus A.: (2000) : http://www.becon.nih.gov/Poster_Abstracts_Exibits.pdf

(156) -. Boas U., Heegaard PMH. (2004) : Dendrimers in drug research : *Chem. Soc. Rev.*: 33; 43 – 63

(157) -. Battah SH., Chee CE., Nakanishi H., Gerscher S., MacRobert AJ., Edwards C.: (2001) : Synthesis and biological studies of 5 aminolevulinic acid containing dendrimers for photodynamic therapy: *Bioconjugate Chem.* 12; 980 – 988

(158) -. Nishiyama N., Stapert HR., Zhang GD., Takasu D., Jiang DL., Nagano T., Aida T., Kataoka K: (2003) :Light-harvesting ionic dendrimers porphyrines

as new photosensitizers for photodynamic therapy: *Bioconjugate Chem.*: 14; 58 - 66

(159) -. Qualmann B., Kessels MM., Musiol HJ., Sierralta WD., Jungblut PW., Moroder L.: (1996) :Synthesis of boron rich lysine dendrimers as protein labels in electron microscopy: *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*

(160) -. Capala J., Barth RF., Bendayana M., Lauzon M., Adams DM., Soloway AH., Fenstermaker RA., Carlsson J: (1996) : Boronated epidermal growth factor as potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors: *Bioconjugate Chem.* 7; 7 – 15.

(161) -. Stiriba S.E., Frey H., Haag R.: (2002) : Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy: *Angew. Chem. Int. Ed.*: 41; 1.329 – 1.334

(162) -. Konda SD., Aref M., Wang S., Brechblet M., Wiener EC. (2001) : Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts: *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.*: 12; 104 – 113.

(163) -. Takahashi M., Hara Y., Aoshima K., Kurihara H., Oshikawa T., Yamashita M.: (2000) : Utilization of dendritic framework as a multivalent-ligand: a functionalized gadolinium (III) carrier with glycoside cluster periphery: *Tetrahedron Lett.*: 41; 8485 – 8488.

(164) -. Nardin EH., Calvo-Calle JM., Oliveira GA., Nussenzweig RS., Schneider M., Tiercy JM., Loutan L., HochstrasserD., Rose K.: (2001) : A totally synthetic polioxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune response in volunteers of diverse HLA types: *J. Immunol.*: 166; 481 – 489

(165) -. Rajananthanan P., Attard GS., Sheikh NA., Morrow WJ.: (1999) : Evaluation of novel aggregates structures as adjuvants: composition, toxicity studies and human responses: *Vaccine*: 17; 715 - 730

(166) -. Maksimenko AV., Mandrouguine V., Gottikh MB., Bertrand J., Majoral J., Malvy C.: (2003) Optimization of dendrimer mediated gene transfection by anionic oligomers: *J. Gene Med.*: 51; 61 – 71.

(167) -. Kukowska-Latallo JF., Chen C., Eichman J., Bielinska AU., Maker JR.: (1999) : Enhancemen of dendrimer mediated transfection using synthetic lung surfactant Exosurf Neonatal: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*: 264; 253 – 261

(168) -. Roessler BJ., Bielinska AU., Janczac K., Lee I., Baker JR. (2001) : Substituted β cyclodextrins interact with PAMAM dendrimer-DNA complexes and modify transfection efficiency: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*: 283; 124 – 129.

(169) -. Kihara F., Arima H., Tsutsumi T., Hirayama F., Uekama K.: (2002) : Effect of structure of polyamidoamine dendrimer on gene transfer efficiency of the dendrimer conjugate with β cyclodextrin: *Bioconjugate Chem.*: 13; 1211 - 1219

(170) -. Bielinska A., Kukowska-Latallo JF., Johnson J., Tomalia DA., Baker JR.: (2002) : Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst pamam dendrimers: *Nucleic Acid Res.*: 24; 2176 - 2182

(171) -. Hudde T., Rayner SA., Comer RM., Weber M., Isaacs JD., Waldmann H., Larkin DP., George AT.: (1999) : Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium: *Gene Ther.*: 6; 939 – 943

(172) -. Wang Y., Bay Y., Price C., Boros P., Qin L., Bielinska A., Kukowska-Latallo J.F., Baker JR., Bomberg JS.: (2001) : Combination of electroporations and DNA dendrimer complexes enhances gene transfer into murine cardiac transplants: *Am. J. Transplant.*: 1; 334 – 338

(173) - Rayner SA., King WJ., Comer RM., Isaacs JD., Hale G., George AJ., Larkin DF: (2000) : Local bioactive tumor necrosis factor (tnf) in corneal allotransplantation: *Clin. Exp. Immunol.*: 122; 109 – 116

(174) -. Wang Y., Boros P., Liu J., Qin L., Bay Y., Bielinska A., Kukowska-Latallo JF., Baker JR., Bromberg JS.: (2000) : DNA/dendrimer complexes mediated gene transfer into murine cardiac transplants ex vivo: *Mol. Ther.*: 2; 602 – 608.

(175) -. Kubasiak LA. y Tomalia DA. (2005) : Cationic dendrimers as gene transfection vectors: Dendri-Poly (amidoamines) and dendri-Poly (propilenimines: En *Polymeric gene delivery principles and applications*: MM. Amiji Ed. CRC Press. Boca Raton

(176) -. Tomalia DA., y Balogh L: Method and article for transfection of genetic material. US 6.475.994. 2002.

(177) -. Wiwattanapatapee R., Carreno G., Malik N., Duncan R.: (2000) : Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: A potential oral delivery systems: Pharm. Res. 17; 991 - 998

(178) -. Hood L., Heath JR., Phelps ME., Lin B.: (2004) : Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine: Science: 306; 640 – 643.

(179) -. Blagosklonny MV.: (2005) : How cancer could be cured by 2015: Cell Cycle: 4; 1 - 10

DISCURSO DE CONTESTACION
DEL
EXCMO. SR. D. ALFONSO DOMINGUEZ-GIL HURLÉ
ACADÉMICO DE NÚMERO DE LA REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

Excmo Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia
Excmas Sras Académicas
Excmo. Srs Académicos
Sras y Sres

Quiero, con mis primeras palabras expresar gratitud y satisfacción. Ha sido un honor para mí recibir el encargo de la Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia para dar contestación al discurso de ingreso como académico de número del Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato.

Para ésta Academia la incorporación de un nuevo académico tiene una especial relevancia como refleja la solemnidad de éste acto. Su presencia hoy aquí es el resultado del consenso alcanzado entre los miembros de nuestra Corporación que en ejercicio de su libertad e independencia deciden la composición de la Academia entre aspirantes de alta cualificación científica y profesional. El lugar que ocupa hoy nuestra Academia en el ámbito sanitario español y que recientemente ha sido reconocida con importantes distinciones se debe, sin duda a la labor desarrollada por todos sus miembros.

Hoy se incorpora a la Real Academia Nacional de Farmacia un profesor universitario con una brillante carrera profesional en una especialidad de gran interés para nuestra Institución. Mi satisfacción se debe no solo a la proximidad en el área de conocimiento sino, y sobre todo, a una larga amistad que se ha fortalecido tanto en las situaciones de

alegría como en los momentos de tristeza cuando la cercanía se hace mas necesaria.

José Luis Vila Jato es un excelente profesional que ha desarrollado su actividad docente, investigadora y asistencial en la Universidad de Santiago de Compostela donde se doctoró con Premio Extraordinario en 1963. Posteriormente amplió sus estudios en París en el Instituto de Biofísica del Instituto Pasteur, para reincorporarse a la universidad compostelana primero como profesor adjunto y después como profesor agregado. El próximo mes de Junio cumplirá 30 años como catedrático del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en donde ha desarrollado una extraordinaria labor académica y creado un equipo de profesionales que goza de prestigio internacional.

El profesor Vila Jato es un destacado investigador en el campo de las ciencias farmacéuticas. Ha publicado cerca de 300 trabajos en revistas nacionales e internacionales, muchas de ellas con alto índice de impacto, dedicadas especialmente al estudio de la formulación farmacéutica en sus aspectos fisico-químico, tecnológico y biofarmacéutico. Su primer trabajo, firmado con su maestro el profesor Rafael Cadórniga, fue publicado en 1961 precisamente en los Anales de la Real Academia de Farmacia. Durante éstos primeros años sus trabajos científicos se centraron en la inestabilidad de medicamentos y en el desarrollo de estrategias para modificar la biodisponibilidad oral de medicamentos aspectos que siguen teniendo una gran importancia en la actualidad. En éste área debe destacarse su contribución al estudio de los cambios producidos durante el envejecimiento de las formulaciones farmacéuticas, acuñando el término de “caducidad biofarmacéutica” en un momento en el que los científicos se ocupaban exclusivamente de la estabilidad física o química de los fármacos en diversas formulaciones y la Biofarmacia no había alcanzado aún su pleno desarrollo.

Posteriormente el profesor Vila Jato desarrolla diversas líneas de investigación de gran interés relacionadas con nuevas formas de liberación controlada de fármacos, la microencapsulación de moléculas con actividad farmacológica o capacidad antigénica, los sistemas de transporte de macromoléculas activas como péptidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico y diversos polinucleótidos y los sistemas mucoadhesivos para la administración por vía oral, nasal o pulmonar.

Deben destacarse especialmente sus aportaciones en el diseño de nuevas formulaciones destinadas a vías de administración alternativas a la vía oral, especialmente la oftálmica y nasal, algunas de las cuales están recogidas en libros especializados de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia. Algunos de sus estudios han conducido a la solicitud de patentes en el campo de los biomateriales o en el diseño de nanopartículas. En éstos últimos años ha trabajado en el campo de la Nanotecnología Farmacéutica, como él ha denominado en el título de su discurso, aplicada a fármacos biotecnológicos y vacunas.

Durante su ya larga vida académica el profesor Vila ha dirigido 30 tesis doctorales, ha figurado como investigador principal en 10 proyectos de I+D financiados en convocatorias públicas y ha participado en numerosos contratos de investigación con empresas farmacéuticas. Como formador de investigadores debe destacarse que bajo su dirección se han formado 5 catedráticos y 9 profesores titulares. Su impulso a las relaciones con investigadores de Europa, Japón y EE.UU. ha favorecido, sin duda, el progreso de su equipo. Además numerosos profesionales farmacéuticos que trabajan actualmente en la industria farmacéutica y en diversas instituciones sanitarias han sido sus discípulos.

El profesor Vila Jato es autor o coautor de 10 libros relacionados con la Tecnología Farmacéutica y la Biofarmacia. La Tecnología Farmacéutica editada por Síntesis en 1997, de la que el profesor Vila fue editor ha sido incorporada como libro de texto en diversas Facultades de Farmacia. Desde 1989 el profesor Vila Jato es Académico correspondiente de esta Real Academia y desde el año 2000 es Académico de número de la Academia de Farmacia de Galicia.

Con José Luis Vila Jato se inicia la expansión de la escuela creada por el profesor Rafael Cadorniga en la Universidad de Santiago hace ahora 50 años. Su proyecto cambió las enseñanzas y la investigación de la Farmacia Galénica en España. Con el transcurso de los años esta escuela se ha fortalecido hasta convertirse en grupo de referencia obligada dentro de las ciencias farmacéuticas en nuestro país. Actualmente está formada por 15 catedráticos de universidad, 52 profesores titulares y cerca de dos centenares de ayudantes, asociados, etc.

En los ambientes tecnológicos europeos se ha introducido con fuerza un nuevo término conocido como "triángulo de conocimiento". Una expresión muy reciente que pretende simbolizar gráficamente los tres ingredientes esenciales de la economía moderna: el conocimiento, la innovación y la educación. Un lado del triángulo representa el conocimiento que se genera mediante la I + D; otro refleja la innovación que convierte el conocimiento en riqueza, y el tercero la educación, que prepara a las jóvenes generaciones para investigar, innovar y valorar el significado de instituciones y empresas en el desarrollo económico.

A esta idea responde el mensaje transmitido en el brillante discurso que acaba de pronunciar el Excmo. Sr. D. José Luis Vila que me atrevo a calificar de tecnológicamente avanzado, con una importante aproximación a la clínica e ilusionante para los profesionales relacionados con la investigación, desarrollo y utilización de medicamentos.

El profesor Vila Jato nos introduce en el mundo de la Nanotecnología Farmacéutica que él sitúa dentro de la Nanomedicina, cuyo objetivo prioritario es optimizar el rendimiento terapéutico de moléculas activas mediante el diseño de nuevas formulaciones farmacéuticas apoyadas en los principios y métodos de la nanoescala. Tomando como referencia el informe publicado en el 2005 por la US Patent and Trademark Office (PTO) las patentes en el área de Nanotecnología en relación con la formulación farmacéutica estaban dirigidas, preferentemente, a mejorar la biodisponibilidad, asegurar una distribución selectiva, reducir la toxicidad y retrasar el aclaramiento de fármacos.

La Nanotecnología figura entre los ejemplos más destacados de tecnologías emergentes y ha despertado grandes expectativas en varios ámbitos directamente relacionados con nuestra vida cotidiana incluyendo la electrónica, la aeronáutica, los textiles, el medio ambiente y la salud.

La Nanotecnología es una ciencia que se desenvuelve, como ya se ha comentado, en una escala extremadamente pequeña, puesto que se refiere habitualmente a tamaños relativos a la llamada nanoescala, que se sitúa, aproximadamente, entre 1 y 100 nanómetros (nm), es decir, entre 1 y 100 mil millonésimas de metro. El prefijo "nano" aparece por primera vez en la literatura científica en 1908, cuando Lohmann lo usó para

clasificar los organismos más diminutos, cuyas pequeñas dimensiones están ahora establecidas como menores de 200 nm. En 1974 Tanigushi fue el primero en utilizar el término Nanotecnología en referencia a la ciencia de los materiales para la futura ingeniería de precisión. Diversos científicos ilustres, entre los que figuran varios premios Nobel, participaron en la iniciación de la Nanotecnología durante la segunda mitad del siglo XX entre ellos Richard Feynman, Eric Drexler, Neal Lane, Horst Störmer y Richard Smalley quien descubrió en 1985 una nueva forma alotrópica de carbono, los fulerenos, conocidos como *buckyballs* en recuerdo de las construcciones geodésicas del famoso arquitecto estadounidense Buckminster Fuller.

En 1 nm” caben” unos 10 átomos de hidrógeno y algo más de 6 átomos de carbono. Al aproximarnos a las magnitudes atómicas la tecnología nanométrica se implica también en la manipulación unitaria de átomos y en el ingreso de técnicas al dominio de la mecánica cuántica cuyas reglas rigen este mundo. Los nanoespecialistas saben, por tanto, que trabajan en las proximidades del extraño mundo cuántico en el que las propiedades de las nanopartículas dependen del tamaño y no de su estructura intrínseca, o donde la ley de Culomb, la fuerza que se ejerce entre dos cargas eléctricas puntuales es directamente proporcional al producto de sus magnitudes e inversamente proporcional a la distancia entre ambos, no se cumple.

El desarrollo de nuevas herramientas permitirá crear micro y macroestructuras con unas propiedades y funciones nuevas que van a revolucionar diversas áreas de la ciencia y de la tecnología.

Sin embargo, muchos expertos han ampliado el límite de la Nanociencia hasta el micrómetro (1000 nm) lo que ha llevado a modificar la definición inicialmente propuesta por el *National Nanotechnology Institute* (NNI) lo que supone la incorporación de dispositivos y materiales utilizados en los últimos años como sistemas de transporte de medicamentos. En el mismo sentido se pronunció la Oficina de Patentes de EE.UU. al analizar el contenido de la clase 977 creada específicamente para la Nanotecnología.

Como señala acertadamente el profesor Vila Jato destaca en la Nanotecnología su carácter pluridisciplinar. La ciencia siempre ha dado sus mejores frutos allí donde confluyen disciplinas diversas; en esos

puntos de intersección en los que se dan cita científicos de mundos distintos, que compiten y colaboran entre sí con objetivos comunes. Esta tesis ha sido demostrada en el pasado: de la Biología y la Química surgió la Bioquímica, y a partir de esta última se desarrollaron tanto la Biología como la Genética molecular. En la actualidad, estamos siendo testigos del emocionante comienzo de un proceso semejante en los lindes que separan la Biología y la Física. Médicos, farmacéuticos, químicos, biólogos, físicos y otros profesionales deberán aprovechar la oportunidad única de ser partícipes y dejar huella en el nacimiento y en la primera infancia de la Nanotecnología.

El Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. ha desarrollado diversos programas con la finalidad de producir entidades multifuncionales, a escala nanométrica, que puedan diagnosticar, liberar agentes terapéuticos y monitorizar el progreso de los tratamientos oncológicos. Todo ello incluye el diseño y la fabricación de agentes de contraste adecuados, que mejoren la resolución de las células cancerosas a nivel de célula individual, y de nanodispositivos capaces de dirigir la diversidad biológica y evolutiva de múltiples células cancerosas que enmascaran un tumor dentro de un individuo.

Para conseguir todo el potencial *in vivo* de la Nanotecnología se deben desarrollar nanotransportadores inteligentes. Además, hay que conocer en profundidad los procesos fisicoquímicos y fisiológicos, puesto que éstos conforman las bases de las complejas interacciones inherentes a la huella de un nanovehículo y de su microentorno. Ejemplos de ello son la estabilidad del transportador, las velocidades de liberación intracelular y extracelular de fármacos en diferentes patologías, la interacción con el entorno biológico y otras barreras localizadas en la "diana farmacológica", ya sea anatómica, fisiológica, inmunológica o bioquímicamente, y la explotación de recursos ofrecidos por los diferentes estados de la enfermedad. El diseño de los transportadores y las estrategias diana pueden variar en función del tipo, estado de desarrollo y localización de la enfermedad.

Las agencias reguladoras en materia de medicamentos y concretamente la *Food and Drug Administration* no se habían planteado hasta recientemente los problemas relacionados con la aprobación de fármacos basados en la Nanotecnología. Todo ha cambiado cuando Wyeth, Merck y Abbott desarrollaron nanopartículas con fines

terapéuticos utilizando *NanoCrystal Technology* aportada por *Elan Drug Delivery*. Merck obtuvo la aprobación de un fármaco producido en nanoescala, el aprepitant, registrado como Emend® e indicado en el tratamiento de la emesis retardada en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia. Wyeth desarrolló un sistema de nanopartículas para la administración del agente inmunosupresor sirolimus y Abbott reformuló el fenofibrato en un sistema constituido por nanopartículas.

Hay diversos aspectos en la expansión de esta nueva tecnología que están adquiriendo gran relevancia como son los relacionados con la nanofabricación, la nanotoxicología, la nanoética o toda la problemática asociada con la propiedad industrial y las patentes.

En términos generales, las invenciones en el ámbito de la Nanotecnología podrían obtener protección por patente, siempre y cuando cumplan las condiciones pertinentes de patentabilidad, pero es necesario tener en cuenta una serie de cuestiones, entre las que destacan las siguientes:

- Uno de los problemas es que las reivindicaciones admitidas son demasiado amplias, igual que sucede con otras tecnologías emergentes. Este hecho se debe, al menos en parte, a la ausencia de estado de la técnica anterior y puede permitir al titular de la patente bloquear vastísimas áreas tecnológicas. En este contexto, también se observa el riesgo de otorgar patentes que se superpongan entre sí. Un ejemplo representativo es el VivaGel® protegido en EE.UU. por un amplio grupo de patentes denominadas *antiviral dendrimers*.
- En lo referente a las condiciones generales de patentabilidad, puede surgir la cuestión de saber si la reproducción a escala atómica de un producto o estructura conocido cumpliría el requisito de la novedad o el requisito todavía más importante de la actividad inventiva.
- Otro aspecto relacionado con el anterior es la cuestión de si los derechos de una patente otorgada para un producto sin especificar el tamaño de la invención podría considerarse violada a raíz de

una invención nanotecnológica equivalente, o si el inventor de esa invención podría basarse en dicha patente para exigir regalías.

El profesor Vila Jato ha destacado en su discurso las principales características físico-químicas, tecnológicas y biofarmacéuticas, así como algunas aplicaciones de los nanotransportadores con mayor interés en el momento actual: los liposomas, las micelas poliméricas, las nanopartículas y los dendrímeros.

Nanoteck, una empresa líder en consultoría sobre Nanotecnología publicó en 2005 el informe” *Six opportunities in Nano-Enabled Drug Delivery Systems*” donde destaca las áreas prioritarias de desarrollo de estos nanosistemas en la terapéutica farmacológica.

Los dendrímeros parecen ser los sistemas que pueden aportar nuevas posibilidades a la nanoformulación farmacéutica por sus ventajas frente a otros transportadores aunque para ello han tenido que superar, en opinión de Sonke Svenson de *Dendritic Nanotechnologies*, dos mitos; el primero es que son excesivamente caros para su comercialización y el segundo es que durante 20 años no han encontrado aplicaciones significativas. *Dendritic Nanotechnologies* ha sido distinguida en 2005 con el premio” *Advanced Medical Applications Technology Innovation of the Year*” por el desarrollo y comercialización de la familia de dendrímeros Priostar®.

En todo caso, los nuevos nanosistemas deberán demostrar, en ensayos clínicos controlados, sus ventajas sobre las formulaciones convencionales en términos de eficacia, seguridad y coste-efectividad. Además, debido a la mayor complejidad en los procesos de fabricación debería prestarse especial atención a la estabilidad de los principios activos, a la homogeneidad entre lotes y a los costes de producción.

En el momento actual se están conociendo las posibilidades de aplicación en Nanotecnología Farmacéutica de los nuevos sistemas de transporte de fármacos como los nanotubos de carbono, los fullerenos o los puntos cuánticos o *quantum dots*. Estos últimos son estructuras cristalinas a nanoescala con una mayor flexibilidad que otros materiales fluorescentes y son apropiados para la construcción de aplicaciones computacionales en las que se utiliza la luz para procesar la información. Los puntos cuánticos están hechos de una variedad de componentes

diferentes, como cadmio o selenio desarrollados principalmente por la empresa *Quantum Dots Corporation* que controla un elevado número de patentes, algunas de las cuales tienen aplicaciones farmacéuticas. El atributo cuántico sirve para recordar que el comportamiento del electrón en dichas estructuras debe ser descrito en términos de la teoría cuántica. Los principales avances en la utilización de los *quantum dots* se han centrado en el campo del diagnóstico tumoral al permitir diferenciar las células tumorales de las células perivasculares y de la matriz del entorno del tumor. Además, los puntos cuánticos pueden ser dirigidos a proteínas específicas en la superficie de las células vivas.

La Nanotecnología va a hacer realidad el antiguo concepto de "terapia dirigida" anticipada por el fundador de la quimioterapia, Paul Ehrlich. En aquella noche de febrero de 1912, en Berlín, al finalizar la representación del *Cazador Furtivo*, ópera de Carl Maria von Weber, Erlich comentaba impresionado entre sus amigos la escena en la que Caspar dice a Max, el guardabosques, que aquella bala mágica siempre acertaba en el blanco. Han transcurrido casi 100 años y el concepto de "bala mágica" continúa siendo un desafío para la terapéutica farmacológica.

La Unión Europea considera la Nanomedicina un área de investigación prioritaria y se esfuerza en atraer a ella a la industria privada. Este fué el objetivo principal del congreso Euronanoforum celebrado el pasado mes de septiembre en Edimburgo y patrocinado por la Comisión Europea. La Nanotecnología es una macro área de investigación calificada de estratégica que recibe 1.300 millones de euros del actual Programa Marco de Investigación Europea (casi el 7,5% del total). Pero dos fantasmas amenazan el éxito de la inversión: la aún escasa implicación del sector privado europeo en I + D en Nanotecnología y la posibilidad de que la sociedad rechace los productos nano, como paso con los transgénicos.

La Fundación Europea de la Ciencia publicó en Diciembre del año 2005 las conclusiones de un amplio estudio prospectivo sobre la evolución de la Nanomedicina y las expectativas para un futuro próximo. En dicho estudio se anuncia la necesidad de desarrollar una estrategia que asegure que Europa no pierda los beneficios que la Nanomedicina aporta a la salud pública. El informe concluye que la Nanomedicina está a punto de ofrecer un cambio en el modelo sanitario, debido a los progresos en el

diagnóstico preciso de las enfermedades, a la posibilidad de administrar fármacos dirigidos a objetivos concretos y a la utilización de herramientas no invasoras basadas en la imagen para el seguimiento de los tratamientos. Este informe destaca además las posibilidades que ofrecen instituciones y empresas europeas en diversas áreas de la Nanomedicina y el incremento en la financiación pública y privada en determinados campos. Se demuestra además que la Nanomedicina ya está proporcionando beneficios de importancia a través de nuevos sistemas de diagnóstico, nanofármacos y nanosistemas que controlan la disposición de medicamentos. Entre los ejemplos mencionados se incluyen los biosensores de Oxford Biosensors, los sistemas de imagen de Philips y Schering y los tratamientos oncológicos basados en polímeros de Celltech.

Deben destacarse finalmente, las recomendaciones que la Fundación Europea de la Ciencia ha hecho públicas en apoyo de la Nanomedicina:

- Un enfoque estratégico de los tratamientos para enfermedades como el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares.
- Planes a 5 y 10 años para permitir a la industria de fabricación avanzar hacia la producción de sistemas de nanodiagnóstico para análisis múltiple *in vitro* y nanosensores y mecanismos *in vivo*.
- Educación y preparación interdisciplinar en Nanomedicina para asegurar que Europa posee suficientes especialistas.
- Apoyo a las colaboraciones en Nanomedicina entre el mundo académico y el mundo industrial, incluyendo el acceso a los lugares de fabricación.
- Reconocimiento de que la Nanomedicina representa un nuevo tipo de fármaco para el que es necesario establecer una normativa.

- Enfrentarse a los problemas de seguridad y ambientales como la nanotoxicidad.
- Asegurar que la Administración política, los medios de comunicación y el público en general obtengan la información adecuada sobre nanomedicina y que entiendan sus ventajas y posibles inconvenientes.

Revistas científicas como *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *Nanotechnology*, *Nano Letters*, *International Journal of Nanosciences*, *International Journal of Nanotechnology*, *Small* y *Nanotechnology Law & Business* informan puntualmente de los avances en la Nanotecnología y de aquellas aplicaciones con mayor interés en el campo de la biomedicina.

Nanotechnology Law & Business publicó el pasado mes de diciembre las 10 aportaciones con mayor proyección industrial en el campo de la Nanotecnología que se habían publicado durante el 2005. De ellas, 4 se incluían en el campo de la Nanomedicina y estaban dirigidas al tratamiento del cáncer y a la cirugía.

1. Uso de dendrímeros con capacidad para destruir células cancerosas: Baker y col. describen al dendrímero como un “caballo de Troya” para las células tumorales puesto que es capaz de unirse a ellas y liberar el agente quimioterápico que las destruirá. Estos investigadores, trabajando en ratón, fueron capaces de rastrear un marcador fluorescente para visualizar la liberación del fármaco a nivel tumoral. También observaron que éste método fué 10 veces más efectivo en el retraso del crecimiento tumoral que el fármaco administrado solo y significativamente menos tóxico para el ratón. Los resultados de éste estudio fueron publicados en *Cancer Research* (15 Junio 2005).

2. Mecanismos de nanocables para la detección fácil y rápida del cancer: Un equipo de la Universidad de Harvard diseñó un detector altamente sensible basado en nanocables que puede detectar simultáneamente múltiples marcadores cancerígenos. Estos investigadores crearon un mecanismo con nanocables que conducen una

pequeña corriente con receptores para ciertos marcadores cancerígenos. Cuando éstas proteínas indicadoras contactan con el receptor, se provoca un cambio momentáneo en la conductancia que permite distinguir entre varios marcadores con una selectividad prácticamente perfecta. Este estudio fue publicado en *Nature Biotechnology* en octubre 2005.

3. Tratamiento del cáncer con interferencia en el ARN y nanopartículas. Introduciendo cadenas de ARN terapéutico capaces de aparearse con las cadenas de ARN de los genes responsables de las enfermedades, los ARN de interferencia desencadenan una respuesta inmune antiviral que destruye ambas cadenas, con lo que se priva a las células cancerosas de todas las proteínas que necesitan. El problema surge al intentar introducir suficiente cantidad de ARN terapéutico en las células diana. Mark Davis y su equipo han diseñado un sistema basado en la encapsulación o introducción del ARN incorporado de un sistema de nanopartículas poliméricas que contienen ciclodextrinas. El estudio fue publicado en *Cancer Research* (1 de octubre de 2005) y el sistema se encuentra actualmente en fase de investigación clínica.

4. Utilización de mallas de nanofibras para detener el sangrado para cirugía más segura. Se trata de una bio-barrera transparente basada en la utilización de péptidos autoensamblados que conforman una malla de nanofibra que gelifica sobre la herida, detiene el sangrado y evita las infecciones. Dicha malla de nanofibra no es tóxica y se metaboliza fácilmente dentro del organismo. El estudio fue publicado en *Proceeding of the National Academy of Sciences* (14 de junio de 2005).

El impresionante avance de la ciencia y de la tecnología causan un cierto desasosiego entre los estudiosos de las ciencias biomédicas hasta llegar a identificarnos con aquella sentencia de Benjamín Franklin:” *El progreso del conocimiento humano será rápido y descubrirá cosas hoy inconcebibles. Estoy apesadumbrado de haber nacido tan pronto, pues no alcanzaré la felicidad de conocer lo que se conocerá en el futuro*”.

La Real Academia Nacional de Farmacia es consciente de la importancia que tendrá la Nanotecnología en la investigación y desarrollo de medicamentos en los próximos años. Prueba de ello es la inclusión, en el Diccionario Terminológico de Ciencias Farmacéuticas español-inglés, inglés-español, que nuestra Institución tendrá finalizado este mismo año, de más de 40 términos relacionados con estas tecnologías.

Cuando terminaba de escribir estas líneas llegaron a mi recuerdos inolvidables del viejo caserón de Fonseca, en Santiago. Allí con D. Rafael, Vila, Berta, Isaac, Matías y otros muchos me estaba formando como profesional y también como persona. Aunque como decía Oscar Wilde” *el único encanto del pasado es que es pasado*” gracias por compartir aquellos años.

No quisiera finalizar mi intervención sin una cariñosa referencia a la familia del profesor Vila Jato que nos acompaña en este acto y especialmente a su esposa la Dra. Hortensia Moriente Quer también farmacéutica y compañera entrañable en aquellos momentos que iniciábamos con ilusión nuestras carreras profesionales en la Universidad de Santiago. A todos ellos nuestra más calurosa y sincera felicitación.

La Real Academia Nacional de Farmacia recibe con gran satisfacción al nuevo académico, el profesor José Luis Vila Jato, en la seguridad de que su alta preparación científica, experiencia acreditada e independencia de criterio serán de gran utilidad para el progreso de nuestra Institución en apoyo de las Ciencias Farmacéuticas. En nombre de todos los miembros de esta Real Academia, cuya representación ostento en este momento, y en el mío propio reciba nuestra más cordial bienvenida. Muchas gracias.

Bibliografía seleccionada

- Bawa R., Bawa SR., Maebius SB., Flynn T., Wei C.: Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine: 2005; 1; 150-158
- Bianco A.: (2004) : Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules.: Expert Opin Drug Deliv: 1; (1) ; 57 -65
- Brower V.: (2006) : Is nanotechnology ready for primetime: J. National Cancer Institute: 1; 9 – 11
- Cancer Nanotechnology Plan: A strategic initiative to transform clinical oncology and basic research through the directed application of Nanotechnology: U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Health National Cancer Institute. 2004
- Freitas R.: (2005) : What is Nanomedicine ? : Dis Mon: 325 – 341
- Furnes G.: (2005) : The role of drug delivery in tumor-targeting drugs: compounds are waiting: Drug Delivery Technology: Vol 5; nº 3
- Gillies ER., Frechet JM.: (2005) : Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery: Drug Discovery Today: 1; 35 – 42
- Gordijn B.: Nanoethics: from utopian dreams and apocalyptic nightmares towards a more balanced view: (2005) : Sci. Eng Ethics: 11; (4) ; 521 - 523
- Joachim C.: To be nano or not to be nano?: (2005) : Nature Materials: Vol: 4. <http://www.nature.com/naturematerials>
- McCarthy TD., Karellas P., Henderson SA., Giannis M., O'Keefe DF., Heery G., Paull JRA., Mattheus BR., Holan G.: (2005) : Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based

microbicides for HIV and STI prevention: *Molecular Pharmaceutics*: 2; (4) ; 312 – 318

- Moghimi SM., Hunter AC., Murray JC: (2005) : Nanomedicine: Current status and future prospects: *FASEB Journal*: 19; 311 – 330
- Nano Markets: The impact of Nanotechnology in drug delivery: *Global Developments, Market Analysis and Future Projects*: 21 Mars 2005
- Oberdörster G., Oberdörster E.: (2005) : Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles: *Environmental Health Perspectives*: 113; (7) ; 823 – 839
- Sahoo SK., Labhasetwar V.: (2003) : Nanotech approaches to drug delivery and imaging: *Research Focus*: 8; (24) ; 1112 – 1120
- Sinha N., Yeow JT.: (2005) : Carbon nanotubes for biomedical applications: *IEEE Trans Nanobioscience*: 180 – 195
- Stylios GK., Giannoudis P.: (2005) : Application of nanotechnologies in medical practice: *Injury Int J. Care Injured*: 365; S6-S13
- Svenson S., Tomalia DA.: (2005) : Dendrimers in biomedical applications: reflections on the field: *Adv. Drug Deliv. Rev.*: 57; 2106 – 2109
- Till MC., Simkin MM., Maebius S.: Nanotech meets the FDA: A success story about the first nanoparticulate drugs approved by the FDA. *Nanotechnology Law & Business*: 2005; 2.2; 163 – 167
- Top ten nanotech breakthroughs of 2005: *Nanotechnology Law & Business*: 2005; 2; (4) ; 414 – 417
- Vicent MJ., Duncan R.: Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer: (2006) : *TRENDS in Biotechnology*: 24; (1) ; 39 - 47
- Warren CW. : (2006) : Bionanotechnology progress and advances: *Biology of Blood and Marrow Transplantation*: 12; 87 – 91
- Yang H. Kao WJ.: (2006) : Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications: *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*; 17; (1 – 2) : 3 - 19

